

## PROYECTO FINAL DE CARRERA

Enginyeria Tècnica Industrial, Especialitat Química Industrial

---

### DESARROLLO DE MICROSENSORES DE OXÍGENO DISUELTO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS

---

Javier Ibáñez Abad

Cerdanyola del Vallès, Septiembre 2010









David Gabriel Buguña, professor del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, María del Mar Baeza Labat, professora del departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i Gemma Gabriel Buguña tutora de l'empresa col·laboradora Institut de Microelectrònica de Barcelona (IMB-CNM).

CERTIFIQUEN:

Que l'alumne Javier Ibáñez Abad ha dut a terme, sota la nostra direcció, el treball amb títol **"Desarrollo de Microsensores de Oxígeno Disuelto para la Caracterización de Biopelículas"** que presenta en aquesta memòria, la qual constitueix el seu treball en l'assignatura "Projecte Final de Carrera" (Codi 24675).

I perquè consti als efectes que correspongui, es presenta el treball esmentat davant l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona, signant el present certificat.

Cerdanyola del Vallès, 14 de setembre de 2010

David Gabriel Buguña

M<sup>a</sup> del Mar Baeza Labat

Gemma Gabriel Buguña



## **Agradecimientos**

En primer lugar me gustaría agradecer a David Gabriel, M<sup>a</sup> del Mar Baeza y Gemma Gabriel por su colaboración, apoyo y disponibilidad. Esto ha resultado clave para poder sacar adelante este proyecto.

Del mismo modo agradecer la colaboración de la empresa Institut de Microelectrònica de Barcelona (IMB-CNM) por las facilidades que han dado en cuanto a acceso y horarios, permitiendo horarios de trabajo en los laboratorios muy flexibles y acceso a equipos e instalaciones de última generación. Gracias a las instalaciones y a las explicaciones de Gemma Gabriel, la tutora en la empresa, ha resultado una estancia muy interesante y complementaria a la formación universitaria.

Finalmente agradecer también a familiares y amigos, que aunque ajenos a la universidad y el proyecto han resultado un buen apoyo y fuente de buenos consejos durante estos meses.





# ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1.	Monitorización.....	1
1.2.	Sondas de oxígeno disuelto.....	3
1.2.1.	Electrodo de Clark.....	4
1.2.2.	Microsensores de oxígeno disuelto.....	5
1.2.2.1.	Microsensores de Clark.....	6
1.2.2.2.	Tecnología CMOS.....	8
1.3.	Técnicas electroquímicas.....	9
1.3.1.	Voltamperometría cíclica.....	10
1.3.1.1.	Análisis de los voltamperogramas.....	11
1.3.1.2.	Análisis de curvas hidrodinámicas.....	12
1.3.2.	Linear Sweep.....	13
1.3.3.	Cronoamperometría.....	14
1.4.	Aplicaciones.....	15
1.4.1.	Medida de oxígeno disuelto en biofilms.....	16
1.4.1.1.	Biofiltración.....	17
1.4.1.2.	Lodo granular.....	20
2.	Objetivos.....	23
3.	Materiales y métodos.....	25
3.1.	Microelectrode Arrays (MEAs).....	26
3.1.1.	Estructura de los MEAs.....	26
3.1.2.	Configuraciones de los MEAs.....	27
3.1.2.1.	MEAs de 4x300 $\mu\text{m}$ .....	27
3.1.2.2.	MEAs de 4x120 $\mu\text{m}$ .....	28
3.1.2.3.	MEAs de 11x40 $\mu\text{m}$ .....	29
3.2.	Montaje experimental.....	31
3.3.	Metodología.....	33
3.3.1.	Activación de los microelectrodos.....	34
3.3.2.	Caracterización de los microelectrodos.....	35

3.3.3.	Electrodeposición galvanostática de oro.....	35
3.3.3.1.	Ventajas electrodos modificados con oro electrodepositado.....	37
3.3.4.	Recubrimiento con pHEMA.....	40
4.	Resultados.....	41
4.1.	MEAs de 4x300 $\mu\text{m}$ .....	41
4.1.1.	Protocolo de activación de los MEAS de 4x300 $\mu\text{m}$ .....	41
4.1.2.	Análisis de la pasivación de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ .....	44
4.1.3.	Caracterización de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ de platino.....	46
4.1.4.	Calibración de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ como sondas de oxígeno disuelto.....	47
4.1.5.	Diseño de un protocolo de orificación galvánica de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ .....	50
4.1.6.	Caracterización de los MEAs 3x300 $\mu\text{m}$ orificados.....	52
4.1.7.	Comparación del rango de trabajo entre MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ de platino y orificados.....	53
4.1.8.	Comparación de la funcionalidad como sensores de oxígeno de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ de platino, orificados y recubiertos con pHEMA.....	53
4.1.9.	Análisis de estabilidad de los calibrados de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ .....	56
4.2.	MEAs de 4x120 $\mu\text{m}$ .....	58
4.2.1.	Acondicionamiento de los MEAs de 4x120 $\mu\text{m}$ .....	58
4.2.2.	Caracterización de los MEAs de 120 $\mu\text{m}$ orificados.....	60
4.2.3.	Calibración como sensores de oxígeno de los microelectrodos orificados y recubiertos con pHEMA.....	60
4.2.4.	Medidas de oxígeno en biomasa con MEAs de 4x120 $\mu\text{m}$ .....	62
4.2.4.1.	Medidas de oxígeno en el medio salino del reactor.....	62
4.2.4.2.	Perfil de oxígeno en gránulo de biomasa.....	63
4.3.	Diseño de nuevos MEA.....	64
5.	Conclusiones.....	67
6.	Bibliografía.....	68

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Monitorización

La monitorización puede definirse como la disciplina científica que desarrolla y aplica tecnologías y métodos analíticos, con el objetivo de hacer un seguimiento de la evolución temporal y espacial de la composición de un sistema o proceso en estudio.

La sociedad e industria actuales demandan información analítica cada vez más precisa, desde diferentes campos, como lo son la medicina, la industria química o el medioambiente. Del mismo modo se necesita cada vez más analizadores capaces de determinar menores concentraciones, de mayor precisión y exactitud capaces de obtener la información necesaria en el menor tiempo posible.

Estas necesidades han llevado, en los últimos años, a los investigadores por dos caminos complementarios, el del diseño de analizadores de grandes dimensiones, capaces de determinar diferentes analitos y por otra parte al desarrollo de sensores miniaturizados que permiten la obtención de información in situ, en continuo y a menudo sin la necesidad de mano de obra especializada ni equipos costosos, reduciendo drásticamente los costes de la monitorización.

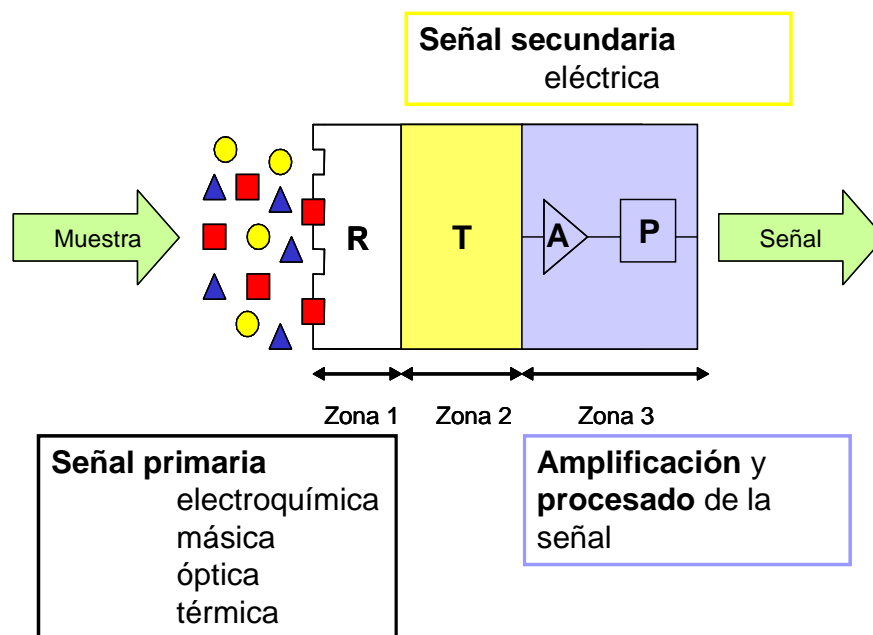
En el presente proyecto se centrará en el desarrollo de sensores amperométricos miniaturizados. Estos equipos presentan sensibles ventajas respecto a los métodos instrumentales convencionales, dado que además del ahorro económico asociado a no necesitar de laboratorios con ambiente controlado ni mano de obra especializada, presentan

ventajas directas asociadas directamente con su tamaño, como por ejemplo la posibilidad de ser transportados y la necesidad de un menor mantenimiento. La implementación in situ aporta además la posibilidad de reducir el tiempo necesario para la obtención de resultados y la posibilidad de disponer de la información útil en tiempo real.

Los sensores deben presentar ciertas características para poder tener utilidad analítica, entre otras pueden destacarse las siguientes: una relación entre señal y concentración del analito mediante algún modelo matemático (en el caso ideal una función lineal), una alta selectividad al analito a determinar (minimizando las interferencias de otros analitos) y una alta sensibilidad de manera que el sensor permita discriminar entre pequeñas diferencias de concentración.

Para su aplicación final es conveniente que los sensores tengan además un tiempo de respuesta rápido, con ciclos de histéresis pequeños, de manera que permiten la monitorización en tiempo real. La minimización del ruido en la medida permite acceder a una ventaja adicional que es la disminución del límite de detección del sensor, debido a un aumento de la relación señal/ruido.

Los sensores se pueden clasificar según el tipo de transductor que transforma la señal primaria generada por el elemento de reconocimiento del sensor en una señal analítica medible del dominio eléctrico [1]. La interacción del analito con el sistema de reconocimiento provoca la variación de una propiedad física que genera una señal primaria (electroquímica,...) que el transductor convierte en una señal medible, habitualmente en una señal eléctrica (señal secundaria). La magnitud de esta señal secundaria es proporcional a la concentración de analito o de una familia de compuestos presentes en la muestra. El receptor y el transductor pueden constituir un mismo elemento o encontrarse físicamente separados aunque en contacto. En la figura 1.1 se muestra un esquema simplificado de los elementos de que consta un sensor.



**Fig. 1.1.** Los sensores químicos en su definición más genérica son un dispositivo analítico constituido por un sistema de reconocimiento selectivo (llamado receptor) y un transductor interno.

De este modo, según el tipo de transductor empleado, podemos diferenciar entre transductores electroquímicos, ópticos, termistores, etc. Cada uno de estos transductores será idóneo para analitos de distinta naturaleza. El proyecto desarrollado se centra en los sensores dedicados a medidas de oxígeno disuelto.

## 1.2. Sondas de oxígeno disuelto

Los sensores de oxígeno son dispositivos encargados de medir la concentración de oxígeno disuelto en el sistema en estudio.

Las sondas de oxígeno disuelto presentan claras ventajas frente a métodos tradicionales como el de Winkler, en cuanto a rapidez en la obtención del resultado, sencillez operacional, robustez y movilidad que permiten el seguimiento en línea y en tiempo real de cualquier sistema o proceso.

Este tipo de sensores es utilizado ampliamente en diferentes ámbitos de la ciencia, en la medicina, donde resulta de interés en la monitorización de pacientes en intervenciones con anestesia o respiración asistida, la monitorización ambiental, como parámetro de calidad de aguas naturales o en la investigación de procesos biológicos, ya que permite calcular el consumo o producción de oxígeno asociado a los mismos.

A día de hoy existen diferentes tecnologías que permiten este tipo de medida, como son los sensores electroquímicos, infrarrojos, de ultrasonidos y más recientemente láser. A continuación nos centraremos en los macro y los microelectrodos de Clark y la tecnología CMOS para el desarrollo de microsensores.

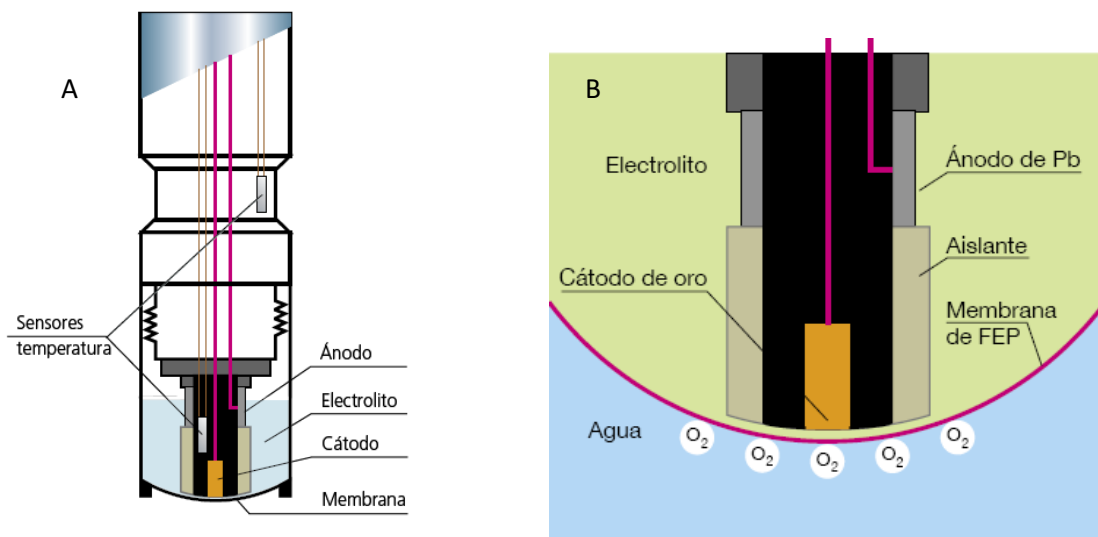
### 1.2.1. Electrodo de Clark

El tipo de electrodo más ampliamente utilizado es la sonda de Clark. Patentado en 1959, por el Dr. Clark, supuso un gran avance respecto a las técnicas tradicionales.

Los electrodos de Clark se basan en la existencia de un ánodo y un cátodo sumergidos en un electrolito. El oxígeno llega al sensor mediante difusión a través de una membrana permeable que separa la muestra y el electrolito y es reducido en el cátodo, dando lugar a una corriente eléctrica medible, que se relaciona con la concentración de oxígeno en el medio.

Se diferencian dos tipos principalmente:

- Sensor polarográfico, al que se le debe aplicar un potencial para efectuar la medida.
- Sensor galvánico, el cual genera un potencial relacionado con la concentración de oxígeno.



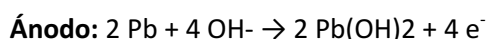
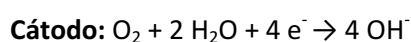
**Fig. 1.2.** A: esquema básico de una sonda de oxígeno disuelto comercial del tipo sonda de Clark. B: Detalle del cabezal de la sonda de Clark. [17]

La reducción de oxígeno se produce en el cátodo, normalmente de oro, que actúa tanto de cátodo como de catalizador de la reacción. El ánodo normalmente es de plomo.

El electrolito soporte proporciona la conductividad necesaria para la celda, siendo habitualmente una solución de KOH. La membrana es selectiva al oxígeno, de teflón FEP (fluoretileno-propileno).

Los sensores de oxígeno disuelto disponen de un sensor de temperatura y ajustan la calibración del instrumento según las condiciones de medida.

Las reacciones que intervienen en el sistema son las siguientes:



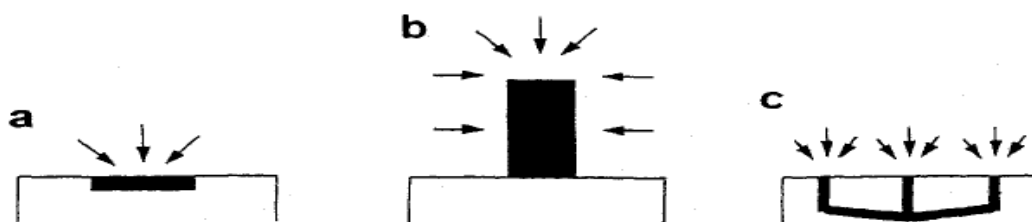
La corriente producida por la reducción de oxígeno en el cátodo es proporcional a la concentración de oxígeno disuelto en la muestra.

### 1.2.2. Microsensores de oxígeno disuelto

El comportamiento y las propiedades de los electrodos cambian sustancialmente al disminuir su tamaño hasta la escala micrométrica, presentando una serie de ventajas adicionales respecto a los macroelectrodos o de tamaño convencional.

El tamaño de este tipo de electrodos provoca que las corrientes que se miden estén en la escala de los nano o picoamperios, varias escalas de magnitud por debajo de los electrodos convencionales; esta característica, que a priori podría parecer una desventaja, permite experimentos en medios de baja conductividad como agua, disolventes orgánicos poco disociantes y materiales sólidos o semisólidos.

La principal diferencia del comportamiento de los microelectrodos está en el proceso de difusión del analito hacia la superficie del electrodo y la cinética del proceso redox. Mientras que en un macroelectrodo la difusión es perpendicular al área del electrodo, en un microelectrodo la difusión tiene un perfil esférico que abarca todas las direcciones de la superficie de éste, en mayor o menor grado y en función de la accesibilidad (ver figura 1.3). Las diferencias en la difusión del analito hacia el electrodo, respecto a los electrodos macro y micro, modifican el proceso limitante para cada uno de éstos, aumentando la eficiencia de la difusión de forma comparable a un electrodo convencional que girara a varios miles de revoluciones por minuto.



**Fig. 1.3.** Geometrías y campos de difusión en microelectrodos. A) disco plano B) cilíndrico C) MEA (array de microelectrodos) [14]

Esta diferencia en el perfil de difusión provoca que la difusión sea el proceso limitante en los macroelectrodos, mientras que la velocidad del proceso redox (cinética) lo será en el caso de los microelectrodos. Las ventajas relacionadas directamente con este control cinético en los microelectrodos son la *alta accesibilidad del analito a la superficie del electrodo*, *el aumento de la relación señal/ruido en este tipo de sensores* y *un aumento de la velocidad de respuesta*. (Rosa Olivé-Monllau et al., 2010)

Igualmente, el tamaño de los electrodos está relacionado directamente con la constante de tiempo característica de la celda electroquímica, lo que permite el empleo de los microelectrodos en la monitorización de procesos que requieran medidas a pequeñas escalas temporales (microsegundos) [14].

Además de las ventajas electroquímicas asociadas, el hecho de contar con sensores de tan reducido tamaño permite experimentos en que sea necesaria información precisa en un punto espacial concreto en tiempo real. Por lo tanto, permite obtener información espacial y temporal de la composición de una muestra o sistema en estudio.

En el ámbito de los microelectrodos de oxígeno, se encuentran dos alternativas básicas: microelectrodos de Clark y CMOS, que se discutirán en los apartados siguientes (1.2.2.1 y 1.2.2.2).

#### **1.2.2.1. Microsensores de Clark**

Se trata de microelectrodos análogos a los macroelectrodos de Clark, pero de reducidas dimensiones. El principio de funcionamiento es exactamente el mismo, pero aportan las ventajas inherentes a la disminución de escala debida a la miniaturización de los sensores.

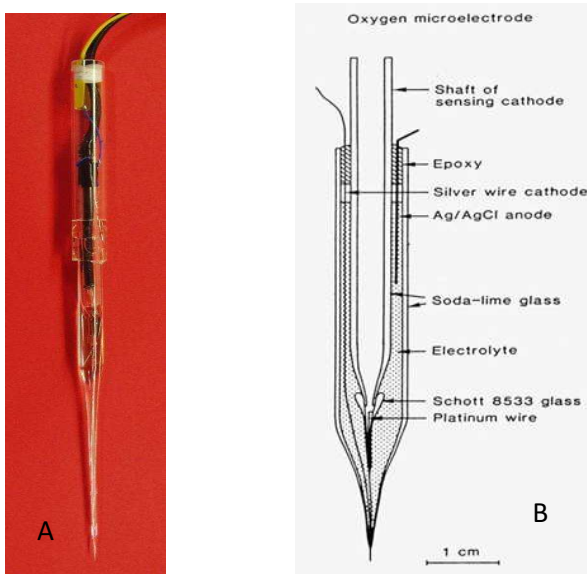


A menudo este tipo de electrodos son fabricados manualmente en los laboratorios, siguiendo un proceso bastante tedioso, largo y complicado [6]:

- 1- Se construye la carcasa exterior, partiendo de una pipeta Pasteur que es estirada manualmente, mediante calentadores, hasta conseguir el diámetro requerido ( $<10\mu\text{m}$ )  
Se abre la punta de la pipeta con un instrumento de precisión y se aplica silicona.
- 2- Se introduce un hilo de platino afinado hasta un diámetro inferior a los  $10\mu\text{m}$ , en un capilar de vidrio, consiguiendo que quede expuesta un área de platino de unos  $10\text{-}20\mu\text{m}$ .  
Es recomendable la orificación del platino dado que elimina interferencias y mejora la respuesta del sensor.
- 3- Se integra el electrodo de referencia ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) y se realizan las conexiones eléctricas.
- 4- Se rellena la cápsula con la solución de electrolito soporte

La principal dificultad asociada con la construcción de estos electrodos es la baja reproducibilidad del proceso de elaboración., que da lugar a electrodos de áreas cambiantes, con diferentes distancias entre los electrodos de referencia y de trabajo, lo que repercute en la respuesta final de cada electrodo particular, que diferirá entre el resto de electrodos.

Además, los electrodos fabricados mediante este procedimiento resultan poco robustos, siendo extremadamente fácil su rotura al mínimo contacto con una superficie sólida, limitando mucho su tiempo de vida y sus posibles aplicaciones reales.

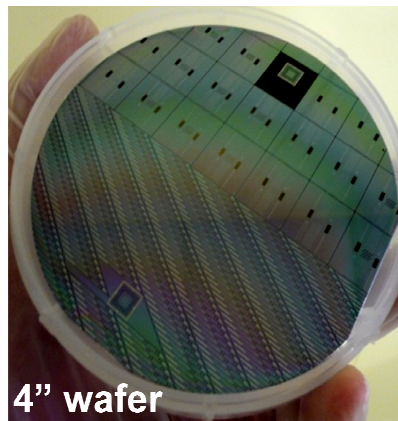


**Fig 1.4.** A: microelectrodo de Clark fabricado manualmente. B: esquema detallado de los componentes de un microelectrodo de Clark [6]

Existen microelectrodos de Clark comercializados por diferentes empresas, siguiendo el mismo esquema que los fabricados en laboratorio (figura 1.4 A), pero mediante métodos más reproducibles, dando lugar a sensores de mejores prestaciones pero de elevado coste.

#### 1.2.2.2. Tecnología CMOS

La tecnología de semiconductor de óxido de metal complementario (Complementary Metal Oxide Semiconductor, CMOS) se basa en el de obleas de silicio (Fig. 1.5.) que son procesadas mediante diferentes técnicas microelectrónicas con el fin de conseguir el esquema eléctrico que se ha diseñado para los microsensores.



**Fig. 1.5.** Oblea de silicio grabada con diferentes microelectrodos de tecnología CMOS

La tecnología CMOS presenta grandes ventajas respecto a la manufacturación de electrodos de Clark, sobretodo en cuanto a reproducibilidad, posibilidad de producción en masa, con la consecuente disminución del precio por unidad, y robustez de los sensores.

El proceso de fabricación es realizado en instalaciones especiales, llamadas sala blanca. Se trata de instalaciones en las que se lleva un control riguroso del ambiente, manteniendo temperatura, humedad, presión y calidad del aire dentro de unos parámetros que protejan los equipos y permitan la fabricación a esta escala. Esto representa el principal inconveniente de esta técnica, pues no resulta económica una instalación de este tipo.

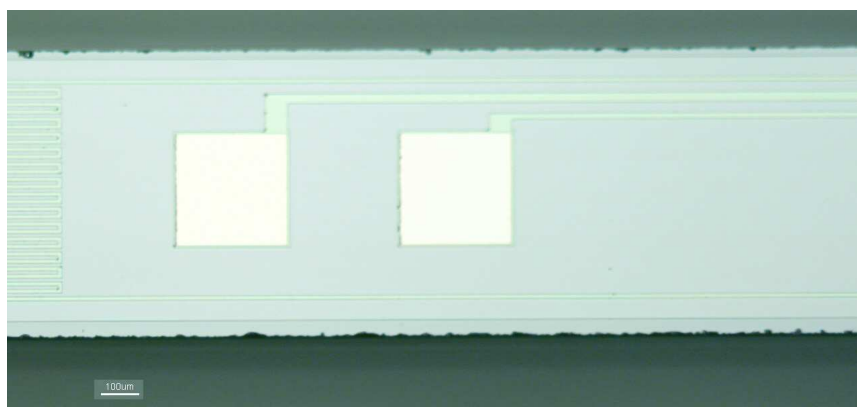
Las técnicas utilizadas en la fabricación de microsensores son principalmente: deposición y crecimiento, fotolitografía y grabado [16].

Las técnicas de deposición y crecimiento, como su propio nombre indica, son las que permiten la formación o deposición de capas del material de interés sobre el sustrato (oblea de silicio). Según el material a depositar existen numerosas técnicas:

- Crecimiento térmico: se hace reaccionar el silicio con un oxidante a altas temperaturas, formando una capa de  $\text{SiO}_2$ .
- Deposición en fase gaseosa: se deposita un material ajeno a la matriz principal. Existen procesos de deposición con y sin reacción.

Las técnicas de fotolitografía permiten definir las zonas del sensor, dejando libre el área de los electrodos y formando cada circuito individual. Esta técnica se basa en el uso de máscaras o transparencias, que contienen los motivos grabados que han de transmitirse a la oblea, gracias al empleo de fotorresinas, un material que cambia su solubilidad al ser irradiado con luz ultravioleta. Podemos diferenciar entre fotorresinas positivas, que se hacen solubles al ser irradiadas, y fotorresinas negativas, que polimerizan al ser irradiadas.

Las técnicas de grabado permiten definir las estructuras de los microsensores o microdispositivos, eliminando las zonas que no han quedado protegidas por la fotorresina en el proceso de litografía. En la figura 1.6 se muestra una ampliación de un microsensor de platino para oxígeno.



**Fig 1.6.** Imagen microscopio óptico de dos electrodos de platino fabricados con tecnología CMOS.

### 1.3. Técnicas electroquímicas

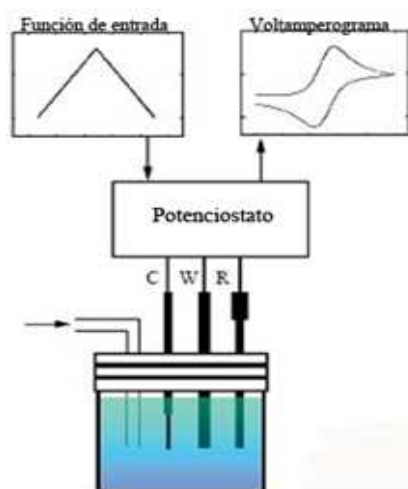
A lo largo de este proyecto se han utilizado diferentes técnicas electroquímicas para diversos fines, como la activación de los electrodos, su caracterización o la calibración previa de estos antes de efectuar las medidas de oxígeno.

Las principales técnicas utilizadas han sido la voltamperometría cíclica, *linear sweep* o barrido lineal y la cronoamperometría; de las cuales se hablará a continuación.

### 1.3.1. Voltamperometría cíclica

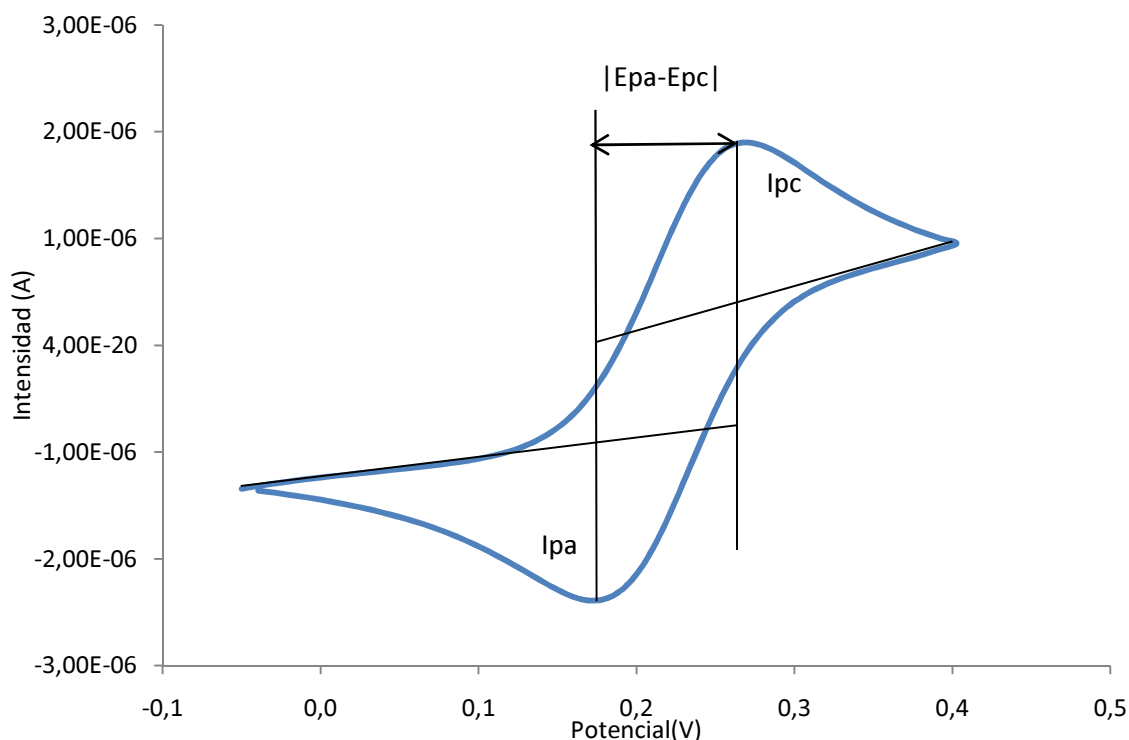
Esta técnica se basa en la realización de un barrido triangular de potencial, iniciando en un potencial  $E_i$  hasta llegar a un potencial  $E_f$  y retornar de nuevo al potencial inicial, o bien a un segundo potencial diferente.

Al aplicar el barrido triangular de potencial (Fig. 1.7. Función de entrada) y registrar la variación de la intensidad respecto al voltaje aplicado, se obtiene un voltamperograma (Fig 1.7.Voltamperograma) que será de gran utilidad para el análisis de procesos redox.



**Fig 1.7.** Esquema voltamperometría cíclica. (C-contraelectrodo, W-electrodo de trabajo, R-referencia)

En el voltamperograma, en el supuesto de realizar el barrido inicialmente en sentido anódico, se observa que al alcanzar cierto potencial aumenta notablemente la intensidad, debido a la reacción de oxidación. Del mismo modo, al realizarse el barrido en sentido contrario se observa un pico de intensidad al producirse la reacción de reducción (Fig 1.8.)



**Fig 1.8.** Voltamperograma cíclico. Solución  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  0.01M en  $\text{KNO}_3$  0.1M y velocidad de barrido  $0.05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

La utilidad de esta técnica depende de la naturaleza del analito a estudiar. Es necesario que sea un analito con posibilidad de ser oxidado o reducido en el rango de potenciales del barrido aplicado y es deseable que la reacción redox sea reversible.

La forma que presentará el voltamperograma dependerá del analito, de su concentración, de la ventana de potenciales escogida y la velocidad de barrido. La forma del voltamperograma será lo que nos dará información acerca del analito y/o del electrodo y según la finalidad del estudio electroquímico nos centraremos en unos parámetros u otros, como se detallará en los apartados siguientes.

### 1.3.1.1. Análisis de los voltamperogramas

Como se observa en la figura 1.8, los datos de interés del voltamperograma son los siguientes:

- $I_{pc}$ : pico de intensidad catódica. Señalará el pico de intensidad alcanzado en el proceso de reducción.
- $I_{pa}$ : pico de intensidad anódica. Señalará el pico de intensidad alcanzado en el proceso de oxidación.
- $I_{pc}/I_{pa}$ : cociente de intensidades
- $|E_{pa}-E_{pc}|$ : diferencia de potencial absoluto entre los picos catódico y anódico.

La diferencia de potencial absoluto entre los picos catódico y anódico es fruto de una combinación entre los diferentes coeficientes de difusión del par y el sobrepotencial necesario para transferir electrones entre la superficie del electrodo y el analito. Esta diferencia de potencial está relacionada directamente con el número de electrones que interviene en la reacción, según la ecuación 1:

$$|E_{pa} - E_{pc}| = 2.218 * \frac{RT}{nF} \quad \text{Ecuación 1}$$

De este modo, a temperatura de 25°C, la separación teórica debería ser aproximadamente de 59mV para parejas redox en que la transferencia sea de un único electrón, independientemente de la concentración o la velocidad de barrido. A mayor separación de picos se tendrá un proceso cada vez más irreversible.

Las intensidades de pico están relacionadas con la concentración de la especie y la velocidad de barrido, según la ecuación 2:

$$I_p = 2.69 * 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $I_p$  es la corriente de pico en Amperios,  $A$  el área del electrodo en  $\text{cm}^2$ ,  $D$  el coeficiente de difusión en  $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $C$  la concentración en  $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$  y  $v$  la velocidad de barrido en  $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ .

De esta manera, para una pareja reversible, el cociente de intensidades  $I_{pc}/I_{pa}$  debería tener un valor cercano a 1.

### 1.3.1.2. Análisis de curvas hidrodinámicas

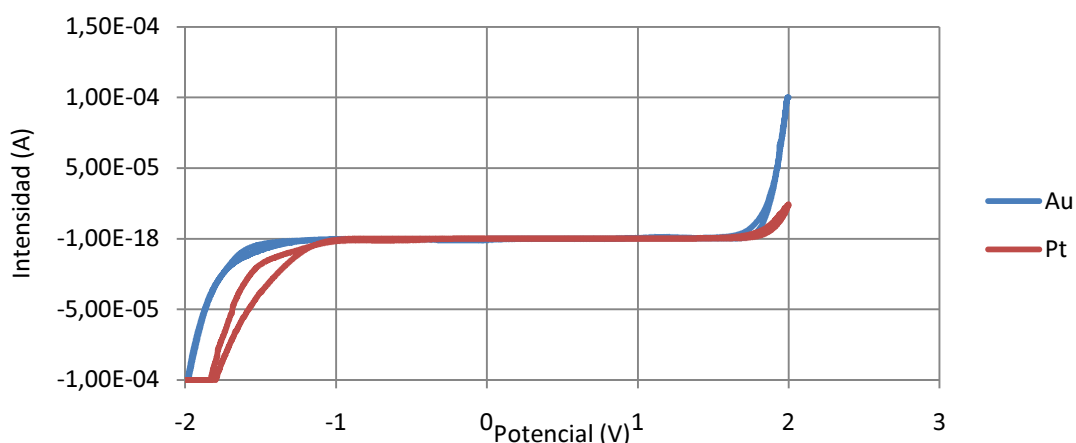
En los extremos de los voltamperogramas cíclicos pueden producirse reacciones parásitas que pueden enmascarar la reacción de interés.

Se puede utilizar la voltamperometría cíclica como técnica para determinar la ventana de potenciales entre los que se puede llevar a cabo la medida sin que se vea afectada por estas reacciones parásitas. Algunas de éstas podrían ser la formación de hidrógeno sobre la superficie del electrodo, en el caso de soluciones acuosas. El gráfico obtenido se denomina curva hidrodinámica, y es una información característica para cada electrodo.

En la curva hidrodinámica se observan básicamente dos zonas diferenciadas, en el caso de una solución en la que simplemente tengamos agua y un electrolito soporte que no presente actividad redox, una zona plana y dos zonas en los extremos en las que aumentará

sensiblemente la corriente (Fig 1.9). La zona de trabajo será la zona plana, dado que las reacciones parásitas no se darán en este rango.

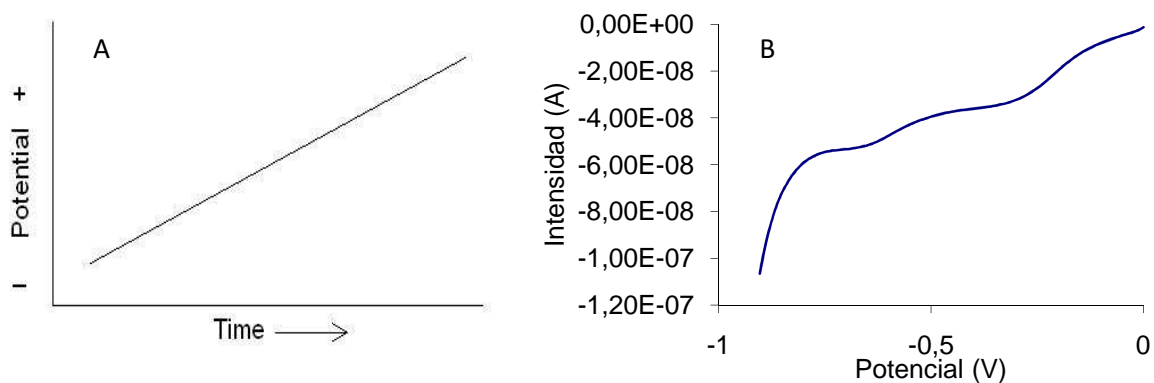
Estas curvas son útiles para la determinación si un tipo de electrodo concreto es viable para la determinación de un analito, conociendo el potencial al que idealmente se deben realizar las medidas para esa finalidad concreta. También se puede emplear para comparar la utilidad de diferentes sensores, por ejemplo en el caso de que diferentes materiales puedan ejercer de catalizadores de las reacciones parásitas, dando lugar a ventanas de trabajo más estrechas, como se observa en la Fig 1.9.



**Fig 1.9.** Ejemplo de curvas hidrodinámicas de un electrodo de platino y uno de platino con oro electrodepositado.

### 1.3.2. Linear Sweep

En la voltamperometría de barrido lineal, o *linear sweep*, se realiza un barrido de potencial desde un potencial  $E_1$  hasta un potencial  $E_2$ , a velocidad de barrido constante, y se registra la corriente que circula a través del electrodo de trabajo, como se muestra en la figura 1.10.



**Fig 1.10.** Bases de la técnica de voltamperometría de barrido lineal. A: ejemplo barrido de potencial *Linear Sweep*. B: voltamperograma linear sweep, reducción de  $O_2$  disuelto.

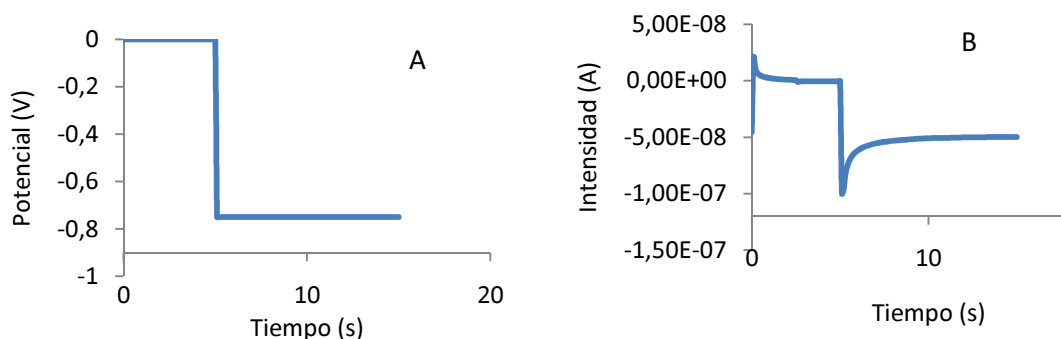
La forma característica de este tipo de voltamperogramas (Fig 1.10. B) se explica de manera análoga a la de los voltamperogramas cíclicos. En el caso del voltamperograma anterior, al comenzar el barrido el potencial inicial no es suficiente para reducir las especies en el medio, al ir aumentando el potencial se observa un primer aumento de la intensidad, señal de que se está produciendo una reacción de reducción del analito, esta intensidad aumenta hasta alcanzar un pico máximo, tras el que retorna a la línea base. Esto se explica debido a que en este punto la reacción se encuentra limitada por la difusión del analito, la cual no es suficiente para mantener la concentración de analito estable en la superficie del electrodo, dando lugar a una menor transferencia de electrones y en consecuencia una disminución de la intensidad registrada.

Esta técnica aporta mucha información cuantitativa de los analitos en solución, dado que la intensidad pico registrada en la reacción redox de la especie estudiada está relacionada con la concentración de ésta. Del mismo modo se puede obtener información cualitativa de las especies en solución, dado que cada especie tiene un potencial característico de oxidación/reducción.

Debido a su utilidad y sencillez se trata, junto a la voltamperometría cíclica, de una de las primeras técnicas a utilizar en cualquier investigación electroquímica.

### 1.3.3. Cronoamperometría

Esta técnica, esquematizada en la figura 1.11 se basa en aplicar un programa de escalones de potencial, en el que se somete al electrodo a un potencial  $E_1$  durante un determinado periodo de tiempo y después se pasar directamente a un potencial  $E_2$ , dando tiempo suficiente para que la medida se estabilice.



**Fig 1.11.** Técnica de cronoamperometría. A: escalón de potencial aplicado. B: cronoamperograma obtenido.



Esta técnica se complementa del *linear sweep*, de modo que se escoje el potencial  $E_2$  que coincida con la zona de potenciales en que el analito de interés se oxida o reduce, de tal modo que se elimina la información que aportan las otras especies en solución que no son de interés en el estudio. Idealmente se escoje el potencial  $E_2$  para asegurar la máxima señal, siendo éste el pico de intensidad máximo obtenido mediante la técnica de linear sweep.

En el cronoamperograma obtenido (Fig 1.11.) se observa un gran aumento inicial de la intensidad de corriente (seg 5), debido al inicio de la reacción redox, momento en el que el analito presenta una concentración elevada entorno a la superficie del electrodo, dando lugar a una excelente transferencia de carga. Al avanzar la reacción, el consumo de analito en la misma y el aumento del grosor de la capa de difusión, hacen que el transporte de materia hasta el electrodo ejerza de parámetro limitante, disminuyendo la intensidad de corriente registrada.

Esta técnica resulta de gran utilidad para análisis cuantitativo del analito, así como la calibración previa necesaria de los sensores, gracias a la gran sencillez a la hora de interpretar los datos del voltamperograma. Si se ha seleccionado el potencial de medida adecuado éste nos proporcionará información únicamente del analito de interés, estando relacionada la intensidad de corriente obtenida con la concentración del analito en la muestra.

Así mismo, se puede utilizar esta técnica para la determinación experimental del coeficiente de difusión del analito, debido a que éste guarda relación con la intensidad medida en la zona de equilibrio.

### **1.4. Aplicaciones**

La miniaturización de sensores de oxígeno, además del aporte de ventajas asociadas con la propia miniaturización, abre un amplio abanico de posibilidades de uso y aplicación.

En consecuencia, este proyecto se centrará en el uso de estos microsensores contruidos con tecnología microelectrónica, como instrumentos de medida de la concentración de oxígeno en sistemas biológicos heterogéneos; como por ejemplo el interior de películas de biofilms o gránulos de biomasa. De manera que se obtendrá información sobre el proceso que está sucediendo, perfiles de oxígeno disuelto en el medio y en la biomasa, o se monitorizaran las condiciones aerobias o anaerobias que se dan a diferentes profundidades del biofilm.

#### 1.4.1. Medida de oxígeno disuelto en biofilms

En los últimos años los procesos biológicos de tratamiento de contaminantes, como la biofiltración o la depuración biológica de aguas residuales, han obtenido una gran aceptación, ganando mucha importancia en numerosos ámbitos industriales. Por este motivo resulta cada vez más importante la optimización de estos procesos, para lo que es clave la obtención de datos fiables acerca de los diferentes parámetros que los regulan.

Gran parte de estos procesos biológicos se dan en condiciones aerobias, en las que los microorganismos oxidan los contaminantes consumiendo el oxígeno que se encuentra disuelto en el medio, transformando los contaminantes en terceras sustancias inertes o menos nocivas y empleando la energía para reproducirse. Por tanto, resulta de capital importancia el control del oxígeno al que tienen acceso estos microorganismos para poder degradar la materia, siendo un parámetro clave en la cinética de degradación de los contaminantes.

Uno de los estudios más realizados en este ámbito son las respirometrías (Fig 1.12). Esta técnica consisten en medir el oxígeno consumido por los microorganismos como parámetro indicador de la degradación del sustrato. Las respirometrías se realizan en minireactores adaptados, controlando los parámetros clave del proceso, como podría ser temperatura, concentración de oxígeno en el medio o concentración de ciertos componentes tóxicos para los microorganismos, de tal modo que permiten optimizar experimentalmente las condiciones de operación del reactor.



**Fig 1.12.** Equipo para realizar respirometrías convencional. Equipado con una sonda de Clark.  
(Respirómetro BM-T, SURCIS, S.L.)

En la actualidad se obtienen fácilmente medidas del oxígeno disuelto del medio mediante macrosensores convencionales (tipo Clark), y se puede aproximar, a partir de diferentes ecuaciones que modelicen la difusión del oxígeno a través de las diferentes fases, así como el consumo de la biomasa, la concentración de oxígeno a diferentes profundidades del biofilm, con el objetivo de modelizar el comportamiento de los microorganismos.

La necesidad de emplear diferentes aproximaciones, como medio para interpretar lo que sucede dentro del biofilm, resulta limitante en cuanto a la incerteza de si los valores calculados mediante estas aproximaciones son representativos de la realidad del proceso complejo que sucede en biofilms que pueden alcanzar un grosor de hasta varios milímetros.

El gran avance tecnológico que permite el uso de microsensores en este ámbito, representa la posibilidad de poder realizar medidas directamente en el interior del biofilm, resultando posible la obtención de un perfil empírico de la evolución de la concentración de oxígeno dentro de éste y pudiendo, de esta manera, hacer aproximaciones cinéticas mucho más precisas de la degradación de contaminantes. Esta información resulta de extrema importancia para comprender mejor y poder optimizar en consecuencia los procesos de biodegradación de contaminantes mediante procesos biológicos en sistemas heterogéneos.

### **1.4.1.1. Biofiltración**

La biofiltración consiste en la depuración de un influente de gas contaminado mediante microorganismos. Estos microorganismos son los responsables, mediante su actividad metabólica, de la degradación de los contaminantes y su transformación en productos menos nocivos o inertes ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en el caso de una oxidación completa) consiguiendo para si mismos la materia y energía necesarias para su crecimiento y reproducción [15].

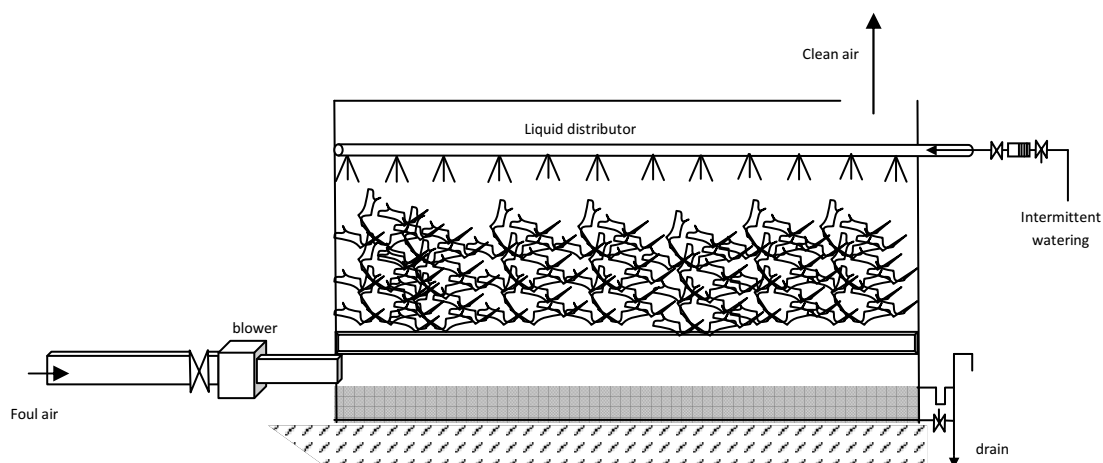
Esta tecnología se ha impuesto con gran fuerza en los últimos años debido a las ventajas asociadas al uso de procesos biológicos respecto a los procesos químicos tradicionales, que suelen necesitar un mayor aporte energético, además del uso de productos químicos y es habitual la formación de subproductos peligrosos cuyo tratamiento encarece el proceso. Además de representar una alternativa económicamente viable representa una alternativa más responsable con el medio ambiente.

En el ámbito de los biofiltros, las tecnologías más empleadas son:

- Biofiltros de lecho fijo
- Biofiltros percoladores
- Biolavadores

Los **biofiltros de lecho fijo** o convencionales (Fig 1.13) consisten en un reactor empacado con un material de relleno, habitualmente orgánico, que ejerce de soporte y aporte de nutrientes para la biopelícula.

El influente de gas contaminado, previamente humidificado, se transfiere de la fase gas a la biopelícula por absorción, dónde se produce la degradación biológica de los contaminantes. El reactor se mantiene regado para asegurar las condiciones óptimas de humedad para la actividad de los microorganismos.



**Fig 1.13.** Esquema básico de un biofiltro de lecho fijo.

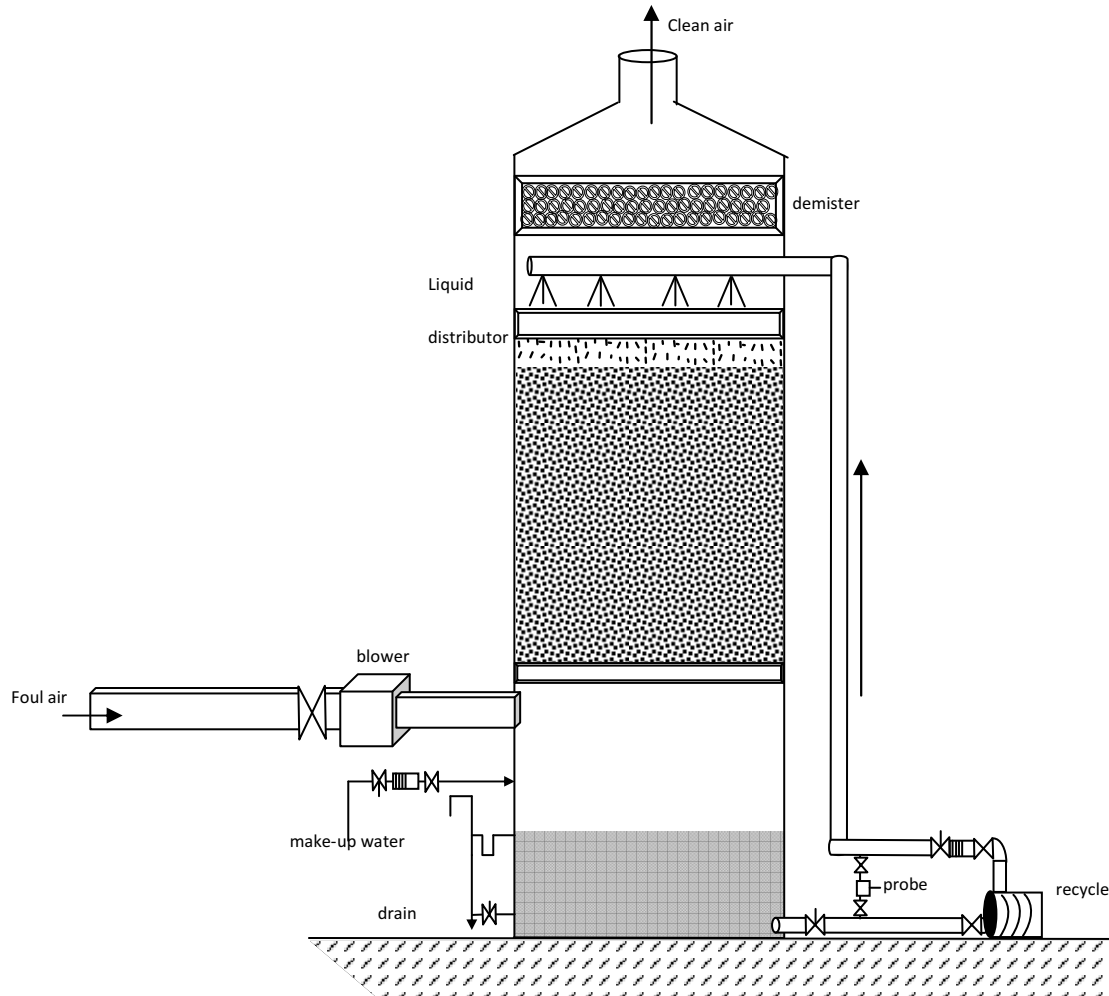
Los biofiltros son reactores fáciles de construir y operar. Esta tecnología permite la degradación de contaminantes poco solubles en agua, gracias al alto contacto gas-líquido, además de poder soportar periodos sin alimentación, siendo idóneos para operaciones intermitentes.

Por otra parte, se trata de reactores que no aceptan una gran carga, siendo necesarios grandes volúmenes de reactor comparados con el resto de tecnologías.

Los **biofiltros percoladores** se diferencian de los de lecho fijo por la existencia de una fase líquida que continuamente se recircula a través del lecho, haciendo innecesaria la humidificación previa del influente de aire, dado que la fase acuosa coexiste en el interior del reactor. En la figura 1.14 se muestra un esquema de un biofiltro percolador.

El material de soporte es sintético, normalmente se trata de materiales cerámicos o espuma de poliuretano, lo que hace necesaria la incorporación de nutrientes básicos para la actividad biológica de los microorganismos a la fase líquida que es recirculada.

Esta tecnología representa ventajas en cuanto al volumen de reactor necesario respecto a los biofiltros convencionales, consiguiéndose además tasas de transferencia del contaminante y oxígeno a la biomasa más elevadas.



**Fig 1.14.** Esquema básico biofiltro percolador

Por otra parte esta tecnología representa unos costes de inversión, operación y mantenimiento más elevados, además de ser una tecnología más compleja [22].

Es más común en este tipo de biofiltros que se produzca un crecimiento excesivo de la biomasa, debido a las altas cargas de trabajo, siendo necesaria la purga de los lodos para evitar taponamientos que aumentarían la caída de presión.

Finalmente, otra tecnología a tener en cuenta es la de los **biolavadores**. Se trata de equipos en los que primero se hace fluir el gas contaminado a contracorriente por una torre de absorción, donde se transfieren los contaminantes y el oxígeno del influente al medio acuoso. Este líquido es alimentado a un bioreactor empacado, donde se produce la degradación de los contaminantes.

Esta tecnología es útil para contaminantes hidrófilos y las principales ventajas que presentan son el fácil control del proceso biológico y la minimización de la acumulación de productos nocivos para los microorganismos, favorecido por la recirculación del líquido. Sin embargo, la necesidad del empleo de dos equipos los hace poco favorables y más difíciles de aplicar en comparación con los biofiltros percoladores.

#### **1.4.1.2. Lodo granular**

En las décadas pasadas se utilizaban tecnologías de degradación de contaminantes basadas en procesos anaerobios al tratamiento de influentes con un alta carga orgánica o como pretratamiento para procesos aerobios, siendo necesario además procesos adicionales con altos tiempos de retención y elevadas temperaturas de trabajo [13].

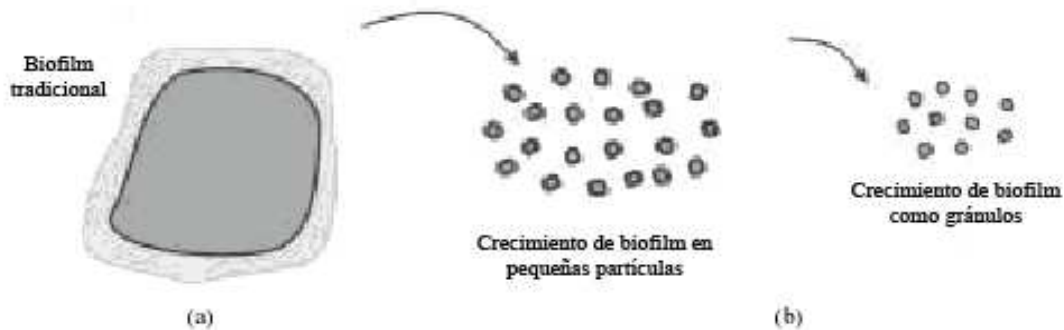
La principal ventaja que representan los procesos aerobios al respecto, es que la cinética de degradación resulta mucho más rápida, debido a que el metabolismo de los microorganismos aerobios es mucho más rápido que el de los anaerobios, permitiendo además operar a temperatura ambiental.

Desde mediados de los 80 estas técnicas se han desarrollado de tal manera que actualmente es común su uso en aguas de baja carga orgánica, de entre 2000 y 5000 ppm de materia orgánica degradable (DQO), en procesos que operan a temperatura ambiental. Más recientemente se han desarrollado procesos viables para aguas con un contenido en DQO de 100 ó 200 ppm.

El éxito de estas nuevas tecnologías se centra en adecuar el número de microorganismos por unidad de materia orgánica biodegradable, de tal manera que si el metabolismo aerobio es 10 veces más rápido que el anaerobio se podría aproximar el tiempo de retención hidráulica de ambos procesos aumentando 10 veces la cantidad de biomasa por unidad de materia orgánica biodegradable.

Los avances que han permitido el aumento en el número de microorganismos activos se basan en nuevas formas de hacer crecer la biomasa en los reactores. Si tradicionalmente se había

hecho crecer la biomasa en forma de películas de un determinado grosor sobre el material de soporte, actualmente se ha conseguido hacer crecer la biomasa sobre pequeñas partículas esféricas o incluso sin material de soporte, formándose gránulos de biomasa (Fig 1.15).

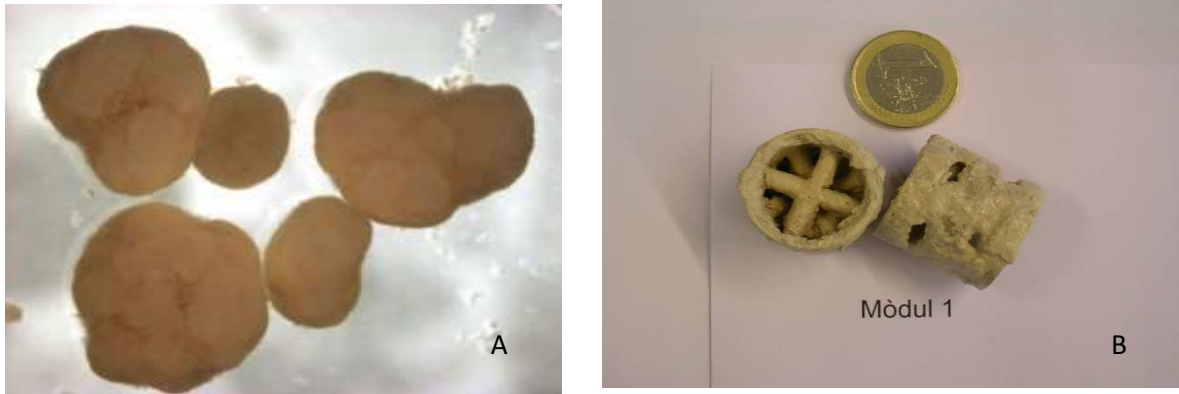


**Fig 1.15** Evolución de los cultivos biológicos tradicionales (a) a los cultivos granulares (b) [13]

Para el crecimiento de estos cultivos granulares se emplean reactores discontinuos secuenciales (*sequencing batch reactors*, SBR), sometiendo a la biomasa a ciertas condiciones que favorezcan la formación de los gránulos, como son [24]:

- **Periodos de saciedad-hambruna:** Los organismos de interés para la formación de los gránulos son capaces de almacenar materia orgánica en las fases de saciedad para consumirla en las fases de hambruna. Con esta estrategia se selecciona a los microorganismos con esta capacidad, eliminando a los que no la poseen (microorganismos filamentosos).
- **Tiempos cortos de sedimentación:** dejando poco tiempo para la sedimentación conseguimos mantener en el reactor a los microorganismos que están creciendo como gránulos y eliminamos a los que lo hacen de forma dispersa.
- **Estrés hidrodinámico:** los esfuerzos a los que son sometidos los gránulos por la circulación del aire a través del reactor favorecen la formación de gránulos y mejoran sus características, consiguiendo gránulos más compactos y regulares.

Estos nuevos tipos de cultivo biológico permiten que el número de microorganismos activos para un determinado volumen de reactor aumente en varios órdenes de magnitud [13], favoreciendo la degradación de materia orgánica de una forma mucho más eficiente que con los cultivos tradicionales sobre un soporte (ver figura 1.16).



**Fig 1.16.** Imágenes biofilm sobre soporte tradicional de anillos (A) y lodo granular (B)

Del mismo modo que esta tecnología ha permitido la viabilidad de multitud de procesos anaerobios, también se puede emplear con la finalidad de conseguir resultados optimizados con los procesos aerobios, aunque en determinados casos el transporte de oxígeno hasta la biomasa, puede resultar el paso limitante del proceso.



## **2. OBJETIVOS**

El principal objetivo de este proyecto es la caracterización y desarrollo de unos microsensores de oxígeno que permitan realizar medidas de la concentración de oxígeno en el interior de biomasa activa. Este objetivo global engloba los siguientes objetivos concretos:

- Análisis viabilidad del microsensor a partir de pruebas con electrodos ya contruidos.
- Caracterización electroquímica de los microelectrodos.
- Diseño de procedimientos de activación y mantenimiento de los microsensores.
- Calibración de los microelectrodos para su uso como sensores de oxígeno y análisis de la influencia del medio en la calibración.
- Analizar la estabilidad de la calibración de los microsensores.
- Obtención de medidas de oxígeno en el interior de gránulos de biomasa.
- Diseño de unos electrodos específicos para la obtención de un perfil de oxígeno en el interior de un gránulo de biomasa.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la realización de este proyecto se han utilizado los instrumentos detallados en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Lista de equipos y fabricantes

Equipo	Fabricante
Potenciostato $\mu$ Autolab type III	Metrohm AG (Herisau, Suiza)
Impedance/gain-phase analyzer SI1260 + Electrochemical interface SI1287	Solartron analytical (Farnborough, UK)
Inolab terminal Level 3	WTW (Weilheim, Alemania)
Sonda oxígeno Cellox 325	WTW (Weilheim, Alemania)
Electrodo Pt Metrohm 6.0351.100	Metrohm AG (Herisau, Suiza)
Electrodo Ag/AgCl Metrohm 6.0726.100	Metrohm AG (Herisau, Suiza)

Del mismo modo, los reactivos empleados han sido los especificados en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Lista de reactivos empleados

Reactivos
Nitrato potásico
Hexacianoferrato(II) de potasio
Hexacianoferrato(III) de potasio
Oro no cianurado

A partir de los reactivos de la tabla 3.2. se han preparado las siguientes disoluciones para el experimental requerido:

- Nitrato potásico 0.1 M: preparada por pesada a partir de la sal de nitrato potásico y disolviendo con agua destilada hasta el volumen requerido. Preparación sin material volumétrico preciso, debido a que no requiere de más precisión por su finalidad.
- Disolución Ferro/Ferri 0.01 M: preparada por pesada directa de las sales de ferro y ferricianuro más la cantidad adecuada de nitrato potásico para dar conductividad al medio (0.1 M). Se disuelve en agua destilada en un matraz aforado hasta el volumen requerido. La disolución se conserva a temperatura ambiente, protegida de la luz solar.

Ambas disoluciones se renuevan semanalmente para garantizar su estabilidad.

### **3.1. Microelectrode Arrays (MEAs)**

Los sensores utilizados en el proyecto se tratan de arrays de microelectrodos, es decir, una matriz en la que encontramos múltiples microelectrodos con los cuales podemos realizar medidas conjuntas o independientes.

Los microelectrodos han sido fabricados mediante tecnología CMOS (ver 1.2.2.2.), en la sala blanca del Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

A lo largo del proyecto se han utilizado diversas configuraciones y materiales, que detallaremos a continuación.

#### **3.1.1. Estructura de los MEA**

Los microelectrodos de oro y platino utilizados en este trabajo se basan en estructuras del tipo pyrex/SiO<sub>2</sub>/metal y pasivadas con SiO<sub>2</sub>/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> elaboradas con las técnicas fotolitográficas estándar.

Como se puede observar en la figura 3.1. el chip se encapsula a unas estructuras que actúan de interfase llamadas Printed Circuit Board (PCB) mediante la técnica de *wire bonding*. Esto permite la conexión física del chip con el equipo de medida, ya sea mediante cables o con otro tipo de interfase. Finalmente los contactos eléctricos se protegen primero con un polímero fotocurable (Epoxi, H70E2) y las pistas de la PCB con (Epoxi OG147-7 de EpoTek) lo que permite la completa inmersión del electrodo en las disoluciones sin peligro de cortocircuito.

### 3.1.2. Configuraciones de los MEA

A lo largo del proyecto se han empleado 3 tipos de MEA diferentes, con variaciones en cuanto a estructura y materiales, los cuales detallaremos a continuación:

#### 3.1.2.1. MEAs de 4x300 $\mu\text{m}$

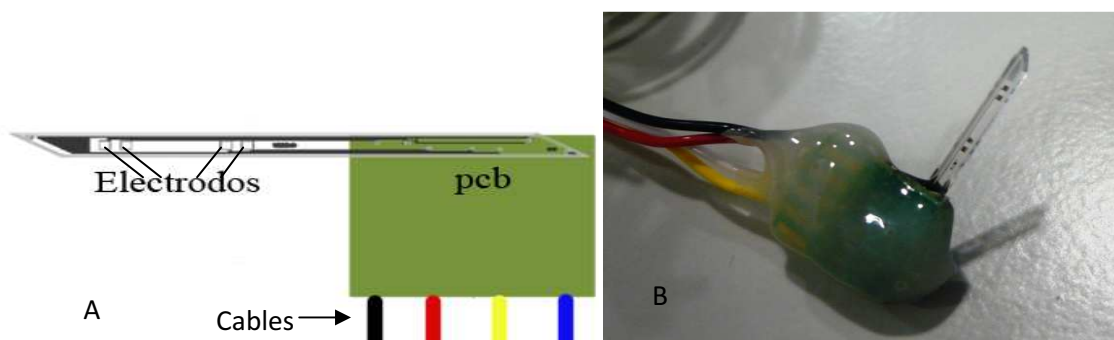
Al comienzo del experimental se aprovechó la existencia de unos MEA ya fabricados para otra finalidad, permitiendo empezar las pruebas inmediatamente y verificar de este modo la viabilidad del proyecto.

Las características de estos electrodos se resumen en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Características electrodos 4x300 $\mu\text{m}$

Arista	300 $\mu\text{m}$
Geometría	cuadrada
Área	90000 $\mu\text{m}^2$
Número electrodos	4
Material	Platino

Este MEA seguía el esquema de configuración de la figura 3.1.



**Fig. 3.1.** A: Esquema MEA 4x300 $\mu\text{m}$  donde se puede distinguir el chip, la PCB y la zona de los cables. B: Fotografía del MEA 4x300 $\mu\text{m}$  una vez encapsulado y conectado a los cables, listo para realizar medidas experimentales.

Como se observa en la figura 3.1. el MEA en forma de aguja consta de 4 electrodos en un extremo, más un sensor de temperatura, no utilizado en este experimental. En el extremo opuesto se encuentran los 4 puntos de conexión, pads de contacto, correspondientes a los electrodos.

### 3.1.2.2. MEAs de 4x120 $\mu\text{m}$

Aprovechando el mismo diseño de MEA empleado en los MEA 4x300 $\mu\text{m}$  se observó la posibilidad de realizar las conexiones de forma inversa, dando la vuelta al MEA.

En este nuevo diseño se utilizaron lo que anteriormente habían sido los contactos para soldar los cables en el pcb como microelectrodos y lo que anteriormente se había utilizado como microelectrodos pasaron a ser los contactos en el PCB.

Con esta modificación se obtuvieron MEAs con las siguientes características (Tabla 3.4.)

**Tabla 3.4.** Características microelectrodos 4x120 $\mu\text{m}$

Arista	120 $\mu\text{m}$
Geometría	cuadrada
Área	14400 $\mu\text{m}^2$
Número electrodos	4
Material	Platino

Estos MEAs siguen el esquema de configuración de la figura 3.2.



**Fig 3.2.** Esquema MEA 4x120 $\mu\text{m}$  en el que se distinguen los 4 electrodos y sus pads de contacto, la PCB de diseño alargado y la zona de los cables.

La utilización de lo que eran los contactos en los MEA 4x300 $\mu\text{m}$  como microelectrodos nos permitió reducir el área del microelectrodo en más de 6 veces el tamaño de la primera, pudiendo así realizar medidas más localizadas y potenciar las ventajas del uso de microelectrodos ( ver 1.2.2.).

Además en este nuevo diseño se ha cambiado la forma de la pcb, haciéndola más alargada lo cual facilita el experimental. En el anterior diseño el efecto memoria de los cables hacía más complicada la colocación de los electrodos siempre en la misma posición, lo que variaba en pequeña medida la celda en cada experimental.

Del mismo modo que en el diseño anterior la PCB se aisló eléctricamente con resina fotocurable (Fig 3.3.), hasta unos  $\frac{3}{4}$  de la altura total, permitiendo sumergir toda esa zona sin peligro de cortocircuito.



**Fig 3.3.** Imagen MEA 4x120um.

### 3.1.2.3. MEAs de 11x40 $\mu\text{m}$

A partir de la experiencia obtenida con las configuraciones anteriores, se diseñaron unos MEAs específicos para la finalidad concreta del proyecto: medir un perfil de oxígeno en el interior de un gránulo de biomasa.

Para este fin específico se necesitan principalmente más puntos de medida, de manera que obtuviéramos datos de la evolución de la concentración de oxígeno en multitud de puntos en el interior del gránulo de biomasa.

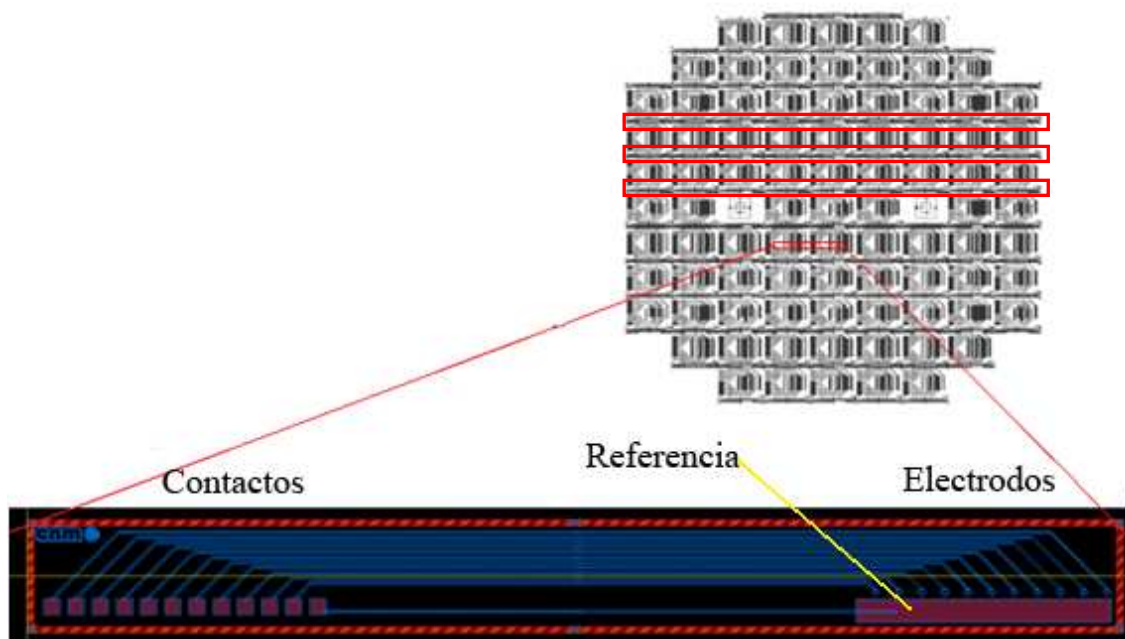
Además, se observó durante el experimental que los microelectrodos de oro presentaban diversas ventajas respecto a los de platino, por lo cual se decidió fabricar los electrodos directamente en este material

Bajo esta premisa se diseñó una aguja de las siguientes características (Tabla 3.5.)

**Tabla 3.5.** Características MEAs 11x40 $\mu\text{m}$

Diámetro (aprox.)	40um
Geometría (aprox.)	circular
Área (aprox.)	1588 $\text{um}^2$
Número electrodos	11
Material	Oro

El diseño de la oblea donde se integran estos MEAs se compartió con el diseño de otros chips de otro proyecto, como se muestra en la figura 3.4.



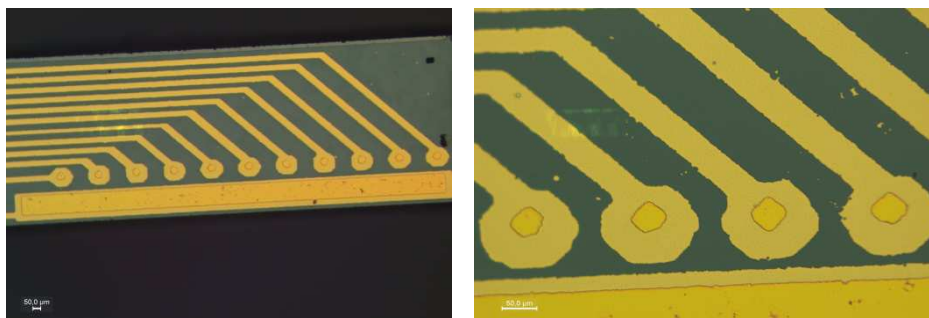
**Fig 3.4.** Arriba: diseño de la oblea. Los rectángulos rojos marcan la posición de los MEAs para medidas de oxígeno. Abajo: Diseño del MEA 11x40 $\mu$ m.

Como se observa en la Figura 3.4. en estos MEA se ha implementado un electrodo de referencia en el propio MEA. Debido al tamaño de estos microelectrodos no son necesarias las medidas a 3 puntas utilizando contraelectrodo, electrodo de trabajo y de referencia, dado que la magnitud de las corrientes medidas es tan pequeña que la caída de potencial es despreciable, permitiendo que el mismo electrodo de referencia actúe a la vez de contraelectrodo. Así, con este diseño de MEA viene integrado todo lo necesario para realizar las medidas.

La PCB se ha construido del mismo modo que en la configuración de 4x120 $\mu$ m.

Estos MEA han sido impresos sobre la oblea mediante el uso de transparencias.





**Fig 3.5.** Imágenes microscopio MEA 11x40um

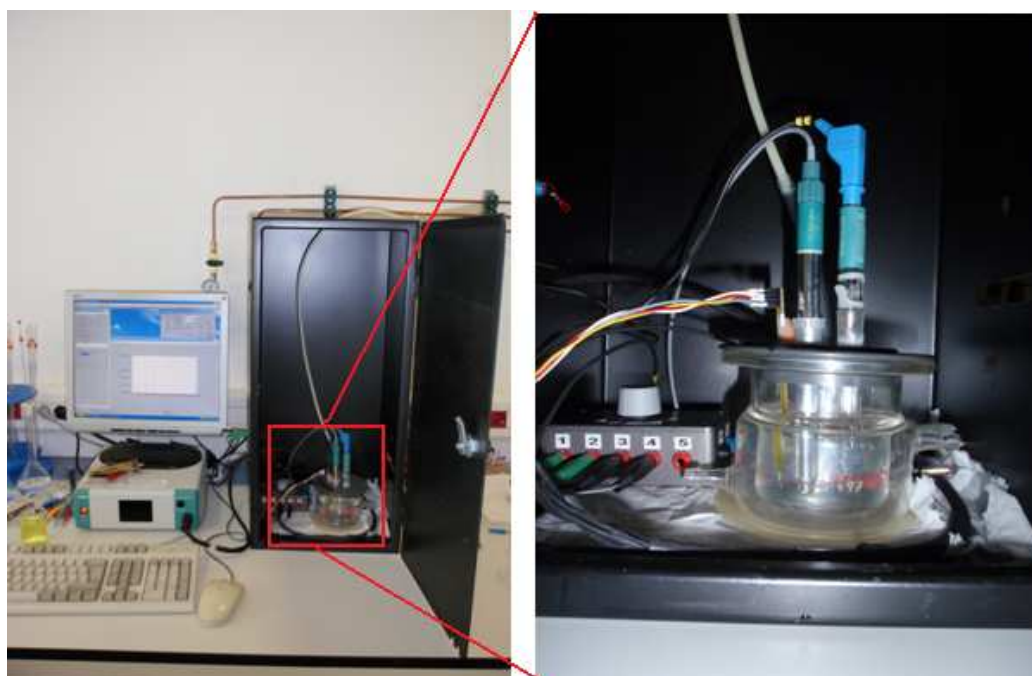
Las áreas se han calculado gracias a un software incluido en el microscopio, obteniendo la media expresada en la tabla 3.5. La desviación es aproximadamente de  $\pm 150 \mu\text{m}^2$ .

### 3.2. Montaje experimental

Durante el experimental se han utilizando básicamente dos montajes:

#### A) Montaje microautolab

En este montaje se ha empleado un vaso de 200ml, con una tapa plástica (que ayuda a mantener la constante de celda igual en las diferentes medidas) con agujeros por donde se introducían los diferentes electrodos y la vía de nitrógeno, como se observa en la Figura 3.6.



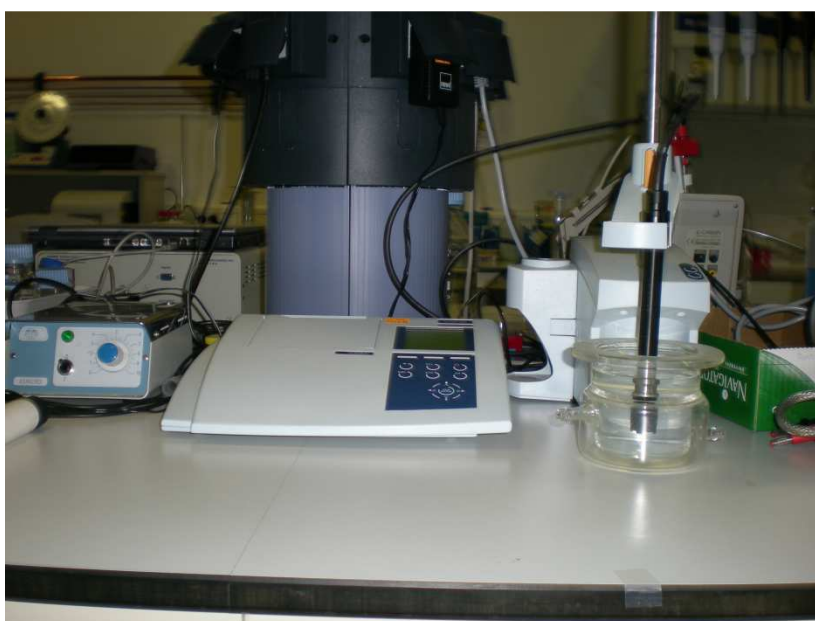
**Fig. 3.6.** Imágenes montaje microautolab.

Todo el montaje se encuentra en el interior de una caja de Faraday, conectada a tierra, gracias a la cual se consigue una gran reducción del ruido eléctrico.

Como se aprecia en la figura 3.6. este montaje consta de 3 electrodos (de izquierda a derecha): electrodo de trabajo, contraelectrodo (electrodo de platino) y electrodo de referencia (Ag/AgCl vs KCl 3M).

La vía de nitrógeno permite desplazar el oxígeno disuelto en el medio. Se emplea a la hora de realizar calibraciones como explicaremos más adelante.

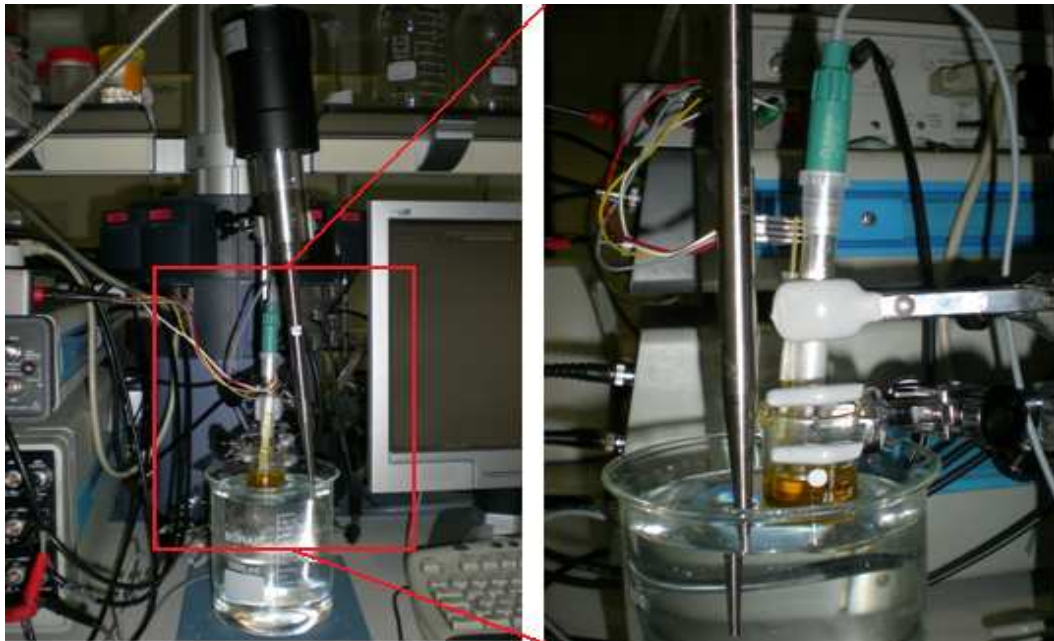
Este montaje se emplea tanto para la activación de los microelectrodos, como para su caracterización y las calibración como sensores de oxígeno; todo esto mediante el potenciostato microautolab (Tabla 3.1.). Para la calibración como sensores de oxígeno era necesario complementar el montaje con una sonda de oxígeno comercial (Fig 3.7.).



**Fig 3.7.** Montaje sonda de oxígeno comercial

### B) Montaje Solartron

En este montaje se ha empleado un vaso de precipitados de 25ml, que contenía la disolución para orificar los electrodos y un vaso de precipitados de 1L que empleábamos como baño de ultrasonidos, como se observa en la figura 3.8:



**Fig. 3.8.** Imagen montaje Solartron

Como se observa en la figura 3.8. en este montaje no es necesario el uso de los tres electrodos, conectándose sólo el electrodo de trabajo y el counter.

El baño de ultrasonidos funciona gracias a una punta de ultrasonidos programable.

Este montaje ha sido el empleado a la hora de orificar los electrodos de platino y para realizar medidas de impedancia, mediante el equipo Solartron.

### 3.3. Metodología

En el proceso de caracterización y optimización de los microsensores se han realizado diferentes pruebas, que se resumen en los siguientes cuatro puntos:

- Activación de los microelectrodos
- Caracterización de los microelectrodos
- Electrodeposición galvanostática de oro
- Recubrimiento con pHEMA

### 3.3.1. Activación de los microelectrodos

El proceso de fabricación al que se someten este tipo de microelectrodos conlleva procesos térmicos que pueden generar una fina capa de óxido pasivante sobre el electrodo. Esta capa de pasivación dificulta el intercambio de electrones con el medio, disminuyendo en cualquier caso el límite de detección de éste.

Del mismo modo, el propio uso de los electrodos o la exposición al aire ambiente pueden ser causa de una pasivación del electrodo.

En general, en cualquiera de los dos casos, esta capa de pasivación provoca que sólo cierta parte de la superficie total del electrodo esté intercambiando electrones con el medio de tal modo que el área activa de éste resulta sensiblemente inferior al área real del electrodo.

Esta disminución del área activa de los electrodos se produce de forma irregular entre unos y otros, siendo más acusada en ciertos electrodos que en otros, de tal forma que se producen respuestas diferenciadas entre electrodos de las mismas características, causando una respuesta poco homogénea e inferior a la que deberíamos obtener.

Con el fin de eliminar esta capa pasivante se ha realizado una activación electroquímica de los electrodos.

A lo largo del experimental se han realizado dos procedimientos de activación diferenciados:

#### A) Activación de los microelectrodos con voltamperometría cíclica:

Los electrodos se han sometido a sucesivos voltamperogramas cíclicos, en una disolución 0.1M de  $\text{KNO}_3$ , entre 0.08 y -2.2V, a una velocidad de barrido  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , en los que se observa, para los potenciales más negativos, la formación de hidrógeno gas en la superficie del electrodo.

El hecho de forzar la formación de un gas tan reactivo como el hidrógeno sobre la superficie del electrodo permite la eliminación de la capa de pasivación existente, dejando la superficie del electrodo activada, facilitando el paso de electrones y homogeneizando de este modo la respuesta entre los diferentes electrodos de trabajo.

Para evaluar el estado de pasivación del electrodo se han realizado voltamperogramas cíclicos, en una disolución 0.1M de  $\text{KNO}_3$  y 0.01M  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ .

Con el objetivo de establecer un protocolo estándar de activación de los electrodos se han realizado diferentes ciclos de activación, tras los cuales se ha realizado el voltamperograma cíclico del par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , hasta obtener una respuesta constante del electrodo.

#### B) Activación de los microelectrodos con cronoamperometría:

Se basa en el mismo principio que la activación mediante voltamperometría cíclica, forzar la formación de hidrógeno gas en la superficie del electrodo, pero usando la cronoamperometría (ver 1.3.3.) como técnica electroquímica.

Se emplea la disolución 0.1M de  $\text{KNO}_3$ , y se programan ciclos de potencial  $E_1 = -2\text{V}$  y  $E_2 = 0\text{V}$ , de modo que en los ciclos de potencial negativo se forma el hidrógeno sobre la superficie del electrodo y durante los ciclos de potencial 0V se eliminan las burbujas que quedan sobre la superficie del electrodo.

Análogamente a la técnica anterior, la respuesta de los microelectrodos se evalúa mediante voltamperometría cíclica de una disolución 0.1M de  $\text{KNO}_3$  y 0.01M  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , determinando que la activación es completa cuando la respuesta del electrodo es constante y homogénea.

### 3.3.2. Caracterización de los microelectrodos

La caracterización de los microelectrodos se ha realizado mediante voltamperometría cíclica de una disolución 0.1M de  $\text{KNO}_3$  y 0.01M  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ .

Las propiedades redox de este analito son muy conocidas, con lo que las desviaciones o similitudes entre nuestro análisis y uno ideal nos permitirán caracterizar nuestro electrodo.

Previo a la caracterización de los microelectrodos se ha procedido a su activación (ver 3.3.1) para obtener una respuesta acorde a las características físicas del microelectrodo.

Los voltamperogramas obtenidos se han analizado obteniendo los valores de interés (Fig 1.7.)

### 3.3.3. Electrodeposición galvanostática de oro

La electrodeposición galvanostática de oro sobre la superficie del electrodo nos aporta diversas ventajas, a priori, la rugosidad del metal electrodepositado nos aporta una mayor área efectiva del electrodo, facilitando la transferencia de carga entre el microelectrodo y el analito.

Para depositar el oro en disolución sobre la superficie del microelectrodo se ha empleado el montaje Solartron (ver 3.2 B). Se hace pasar corriente entre el electrodo auxiliar y el

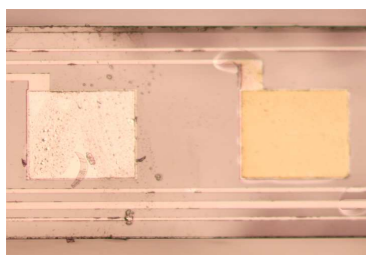
microelectrodo que queremos orificar, de tal manera que éste actúe como fuente de electrones para el oro que se encuentra en disolución y se convierta en oro metálico sobre la superficie del mismo.

Con tal de optimizar la orificación se realizaron pruebas ajustando los diferentes parámetros del proceso:

- **Intensidad de corriente:** con este parámetro podemos variar la densidad de carga que pasa a través del electrodo. Si es demasiado baja la electrodeposición no tendrá lugar y por el contrario, si es demasiado alta la capa electrodepositada resultará menos estable o incluso podríamos dañar el electrodo.
- **Tiempo:** se debe ajustar el tiempo de orificación en función a la intensidad de corriente fijada y el área del electrodo, de manera que sea suficiente para un perfecto recubrimiento de la superficie.
- **Baño de ultrasonidos:** este parámetro es menos crítico, pudiendo ajustarse sin hacer demasiadas pruebas, sin embargo, es de gran importancia debido a que la ausencia de la agitación por ultrasonidos produce electrodeposiciones deficientes por la formación de burbujas de hidrógeno en la superficie del electrodo.

Para evaluar la correcta orificación y establecer un protocolo de orificación estándar se realizaron medidas de impedancia tras la orificación, realizando cambios en los parámetros de intensidad y tiempo de orificación. En el apartado de Resultados se mostrarán los parámetros optimizados para la orificación de los diferentes tamaños de electrodos.

Al electrodepositar el metal sobre la superficie del electrodo, la mayor superficie efectiva hace que la impedancia del electrodo se reduzca sensiblemente. Se utilizaron los valores de impedancia con el fin de caracterizar las orificaciones, diseñando el protocolo de activación con el que obteníamos la mínima impedancia y se comprobó la orificación visualmente (Fig 3.9)



**Fig 3.9.** Imagen de microscopio óptico del electrodo platino (izquierda) y electrodo platino con oro electrodepositado (derecha)

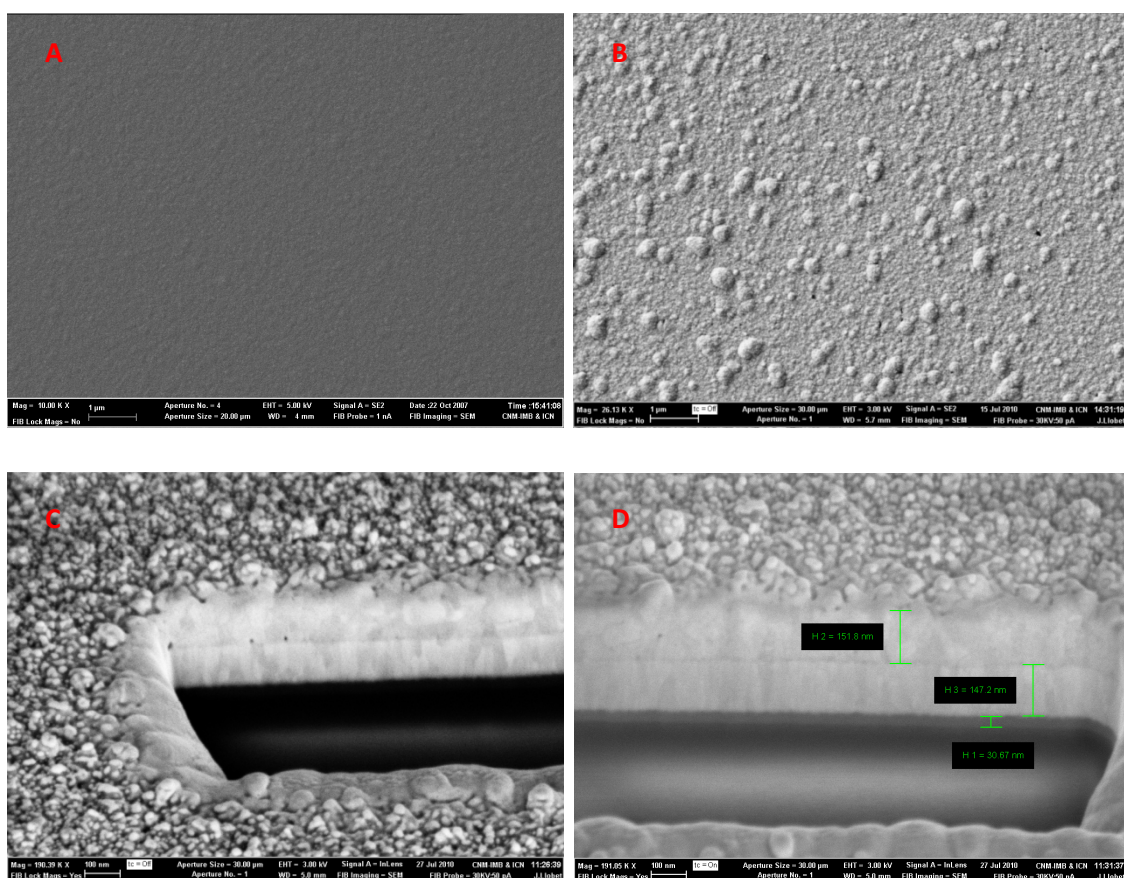


### 3.3.3.1. Ventajas electrodos modificados con oro electrodepositado

La ventaja principal asociada a la modificación de la superficie del electrodo por electrodeposición metálica es el aumento de rugosidad de la superficie.

Una superficie más rugosa representa, para una misma geometría y área de electrodo, una mayor área efectiva, lo que se traduce en un aumento en la facilidad con la que el analito contacta con la superficie de éste para intercambiar cargas. Es por esto que una superficie más rugosa nos permite, además de aprovechar las características difusionales asociadas a los microelectrodos, aumentar la señal obtenida para una misma concentración de analito, disminuyendo así el límite de detección y aumentando la sensibilidad.

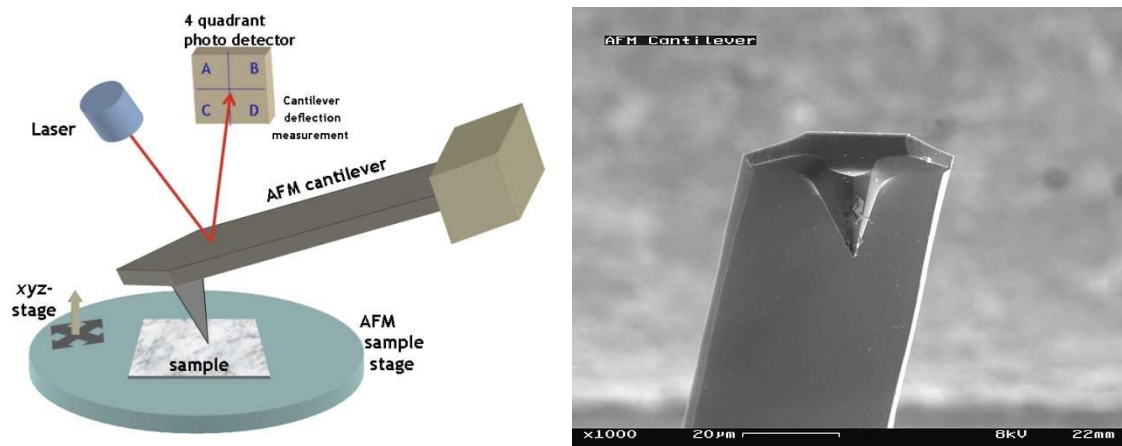
Para comprobar la rugosidad de la capa electrodepositada se tomaron imágenes de la superficie del electrodo (Fig 3.10) mediante un equipo de SEM (Scanning Electron Microscopy) equipado con un FIB (Focused Ion Beam).



**Fig 3.10.** Imágenes de SEM A: de un electrodo de platino y B: uno de oro electrodepositado. Imágenes SEM C: de un corte realizado con el FIB de un electrodo con oro electrodepositado y D: con detalle del grosor de las diferentes capas.

Comparando las imágenes SEM de un electrodo de platino sin modificar, Fig 3.10. A, y uno electrodepositado con oro, Fig 3.10. B, se puede apreciar visualmente la diferencia de rugosidad. La sección obtenida con el FIB permite diferenciar las diferentes capas que tenemos en el chip. La más oscura corresponde al pyrex, la capa superior es la del metal (que tiene un grosor de unos 180 nm; 30nm de Ti + 150 nm Pt), y la última rugosa es el oro electrodepositado. Esta técnica permite determinar que se depositan alrededor de unos 150 nm de oro.

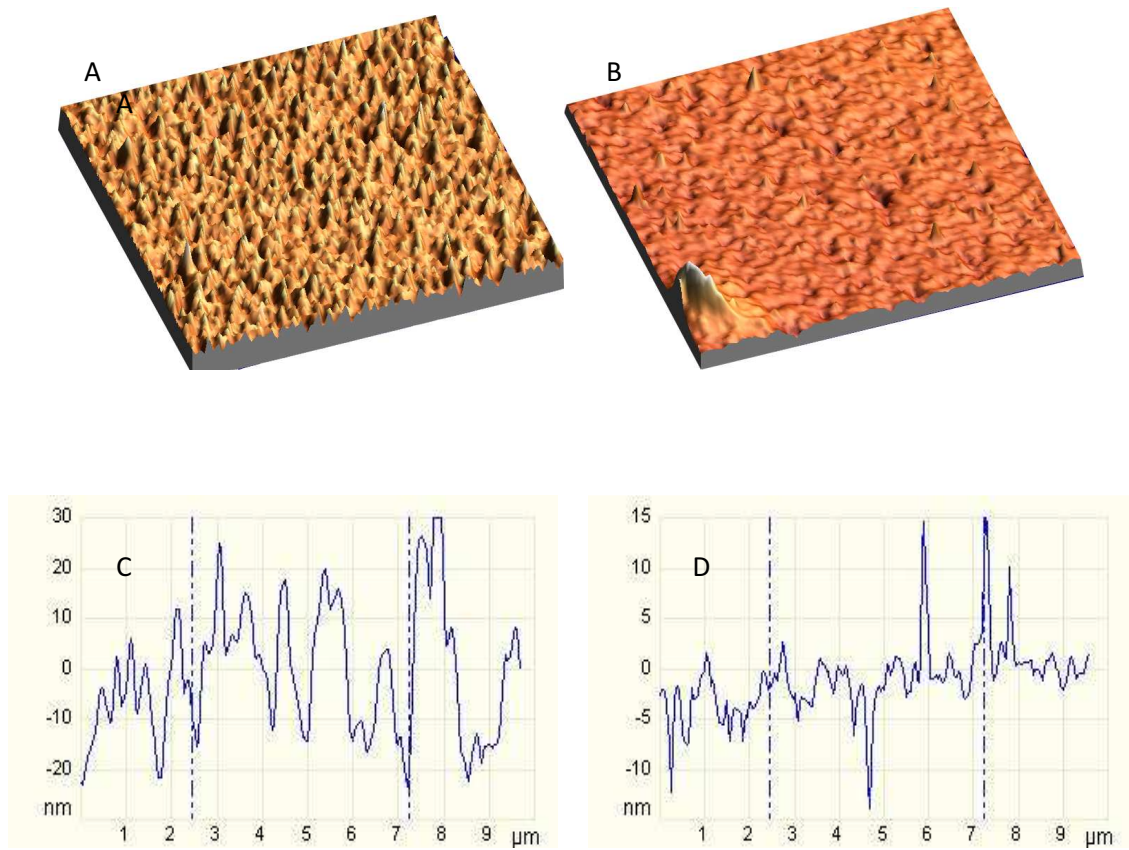
La rugosidad observada en las imágenes de SEM (Fig 3.10) se cuantificó mediante un equipo de AFM (Atomic Force Microscope) a partir de los valores de RMS. Este equipo consta de una sonda o punta (cantiléver) acoplada a un listón muy flexible (Fig 3.10). La sonda recorre la superficie de la muestra y registra las interacciones con ésta mediante un laser, generando una imagen de la topografía de la muestra.



**Fig 3.11.** Izquierda: Esquema equipo AFM. Derecha: Imagen SEM de un cantiléver de AFM. [26]

Mediante el equipo de AFM se compararon las rugosidades de un microelectrodo cuya superficie había sido modificada con oro electrodepositado y la de un microelectrodo fabricado directamente en este material (Fig. 3.13).





**Fig 3.13.** Imágenes en 3D y perfil topográfico de A y C: electrodo modificado con oro electrodepositado, B y D: electrodo sin modificar.

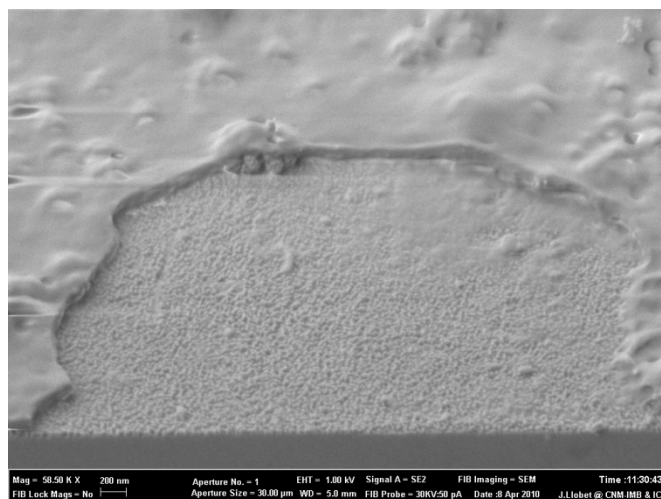
Como se observa en la figura 3.13 la superficie modificada es notablemente más rugosa (con una RMS de  $13\mu\text{m}$  respecto a los  $5\mu\text{m}$  del electrodo no modificado) que la de un electrodo sin modificar, aportando los beneficios mencionados.

### 3.3.4. Recubrimiento con pHEMA

El metal electrodepositado sobre la superficie del electrodo no se encuentra adherido a ésta, de modo que los roces o simplemente con el paso del tiempo esta capa electrodepositada se puede desprender de su superficie.

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de la capa de metal electrodepositado se ha recubierto con pHEMA (poly(2-hydroxyethyl) methacrylate).

El pHEMA se ha depositado sobre los microelectrodos formando una capa ultrafina por el método de deposición química gaseosa fotoiniciada (piCVD). Se trata de una técnica sencilla con la que se consigue depositar una capa de unos 100 nm de grosor sobre el electrodo, consiguiendo mejorar sus propiedades físicas sin interferir en la respuesta eléctrica.



**Fig. 3.14.** Imagen SEM capa de pHEMA sobre electrodo modificado.

## 4. RESULTADOS

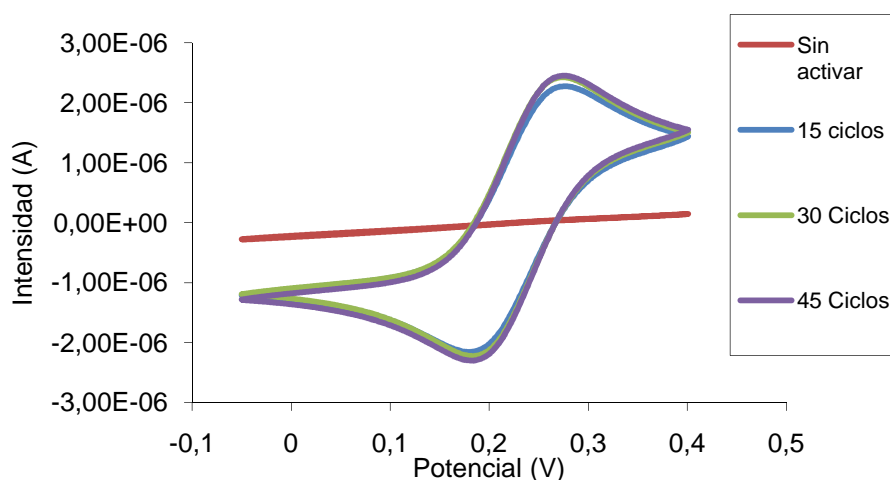
### 4.1. MEAs de 4x300µm

#### 4.1.1. Protocolo de activación de los MEAs de 4x300 µm

Como se ha referido anteriormente (ver sección 3.3.1.) tanto el método de fabricación como el uso y conservación de los microelectrodos genera una capa de pasivación sobre éstos, haciendo necesaria su activación con el fin de obtener una respuesta homogénea y acorde a las características del microelectrodo.

Previo a la activación del electrodo se ha realizado un voltamperograma cíclico entre los potenciales -0.05 y 0.4V con el par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , observándose una respuesta muy distorsionada e intensidades muy inferiores a las que cabría esperar de un electrodo de esas características.

Posteriormente se ha procedido a la activación mediante programas de 15 ciclos consecutivos de voltamperometría cíclica en un medio conductor de  $\text{KNO}_3$  (ver 3.3.1 A). La evolución de la respuesta se ha seguido mediante voltamperometría cíclica del par redox  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  (Fig. 4.1.)



**Fig. 4.1.** Evolución respuesta de los microelectrodos para diferentes ciclos de activación.

Se observa en la figura 4.1. que la definición del voltamperograma cíclico para el par redox inicial, previa a la activación del electrodo es prácticamente nula, sin diferenciarse los picos de oxidación y reducción de la especie electroactiva.

Se hace evidente la eliminación de la capa de pasivación tras los primeros 15 ciclos de limpieza, observándose una gran mejora en la definición del voltamperograma, observándose claramente los picos de oxidación y reducción.

Tras 30 ciclos de activado y en adelante las diferencias entre los voltamperogramas resultan irrelevantes por lo que se concluye que se ha eliminado totalmente la capa de pasivación del electrodo y está preparado para dar una respuesta adecuada a sus características.

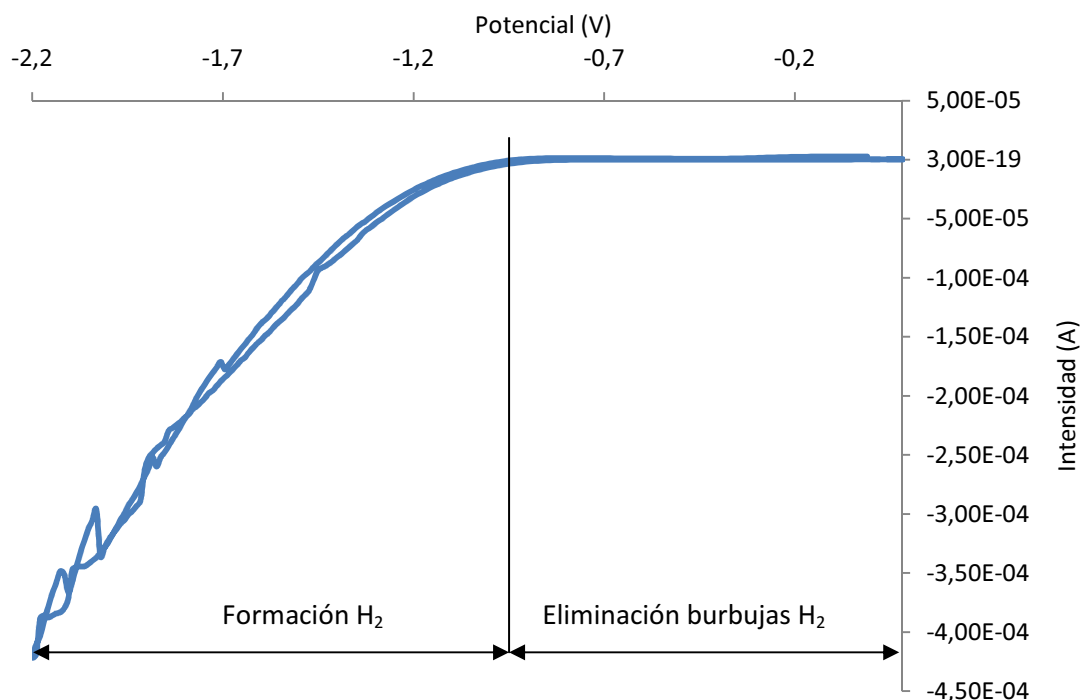
Por lo que se concluye el siguiente protocolo de activación (Tabla 4.1.):

**Tabla 4.1.** Protocolo activación mediante voltamperometría cíclica. MEAs 4x300um

Técnica	Voltamperometría cíclica
Ei	0.08 V
Ef	-2.2 V
Ciclos	30
Velocidad de barrido	100 mV·s <sup>-1</sup>

Este protocolo de activación resultaba ser lento, por lo que se estudió la posibilidad de utilizar otra técnica electroquímica que nos permitiese obtener los mismos resultados en un tiempo más reducido.

Analizando los voltamperogramas de activación, se observan dos zonas de interés para la activación. Una zona de potencial fuertemente negativo, inferior a -1V, en donde se genera el hidrógeno necesario para la limpieza del microelectrodo, y una segunda zona donde el potencial no es suficiente para la formación de hidrógeno, permitiendo la eliminación de las burbujas de gas adheridas sobre la superficie de los microelectrodos que pudieran dificultar la transferencia de carga para la correcta activación (Fig. 4.2.)



**Fig 4.2.** Ejemplo voltamperograma cíclico para activación electrodos 4x300um

Con tal de conseguir el mismo efecto pero en menor tiempo se decidió diseñar un protocolo usando la técnica de la cronoamperometría estableciendo escalones de potencial pertenecientes a ambas zonas de interés.

Se diseñó un programa de cronoamperometría para  $E_1 = -2V$  durante 10s y  $E_2 = 0v$  durante 5s.

Del mismo modo que anteriormente se evaluó la respuesta de los microelectrodos mediante voltamperometría cíclica en una disolución del par redox  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ .

Se observó que se obtenía una respuesta equivalente a la activación mediante voltamperometría cíclica tras 10 escalones de potencial. De este modo el protocolo de activación mediante cronoamperometría queda especificado como se detalla en la tabla 4.2.:

**Tabla 4.2.** Protocolo activación mediante cronoamperometría. MEAs 4x300um

Técnica	Cronoamperometría
$E_1$	-2 V
Tiempo $E_1$	10 s
$E_2$	0 V
Tiempo $E_2$	5 s
Escalones	10

Mediante este nuevo protocolo se consiguió una activación efectiva de los electrodos en 1'30'', una gran mejora respecto a los más de 20' necesarios con el protocolo anterior.

Más adelante, al comprobar visualmente la orificación de los microelectrodos, se observó que parte del oro recubría las pistas metálicas que deberían estar recubiertas con la capa de pasivación.

Analizando las posibles causas se llegó a la conclusión de que las densidades de corriente que soportaban los electrodos durante los protocolos de activación eran demasiado elevadas, de tal manera que dañaban la capa de pasivación levantándola y haciendo que la respuesta del electrodo fuera poco reproducible.

Con tal de solucionar este problema se limitó la corriente que pasaría por los electrodos durante las activaciones. En el caso de los electrodos de 300 $\mu$ m se limitó a un valor máximo de 0.1 mA, lo que representa un densidad de corriente de 1111 A/m<sup>2</sup>.

Se observó que el límite de corriente no afectaba significativamente a la activación de los microelectrodos, haciendo innecesaria su modificación. Del mismo modo, los electrodos activados con el límite de corriente no presentaron daños en la pasivación de las pistas.

#### **4.1.2. Análisis de la pasivación de los MEAs 4x300 $\mu$ m**

La conservación y uso de los microelectrodos puede generar una capa de pasivación sobre el microelectrodo del mismo modo que se genera la capa de óxido por las condiciones térmicas de la fabricación.

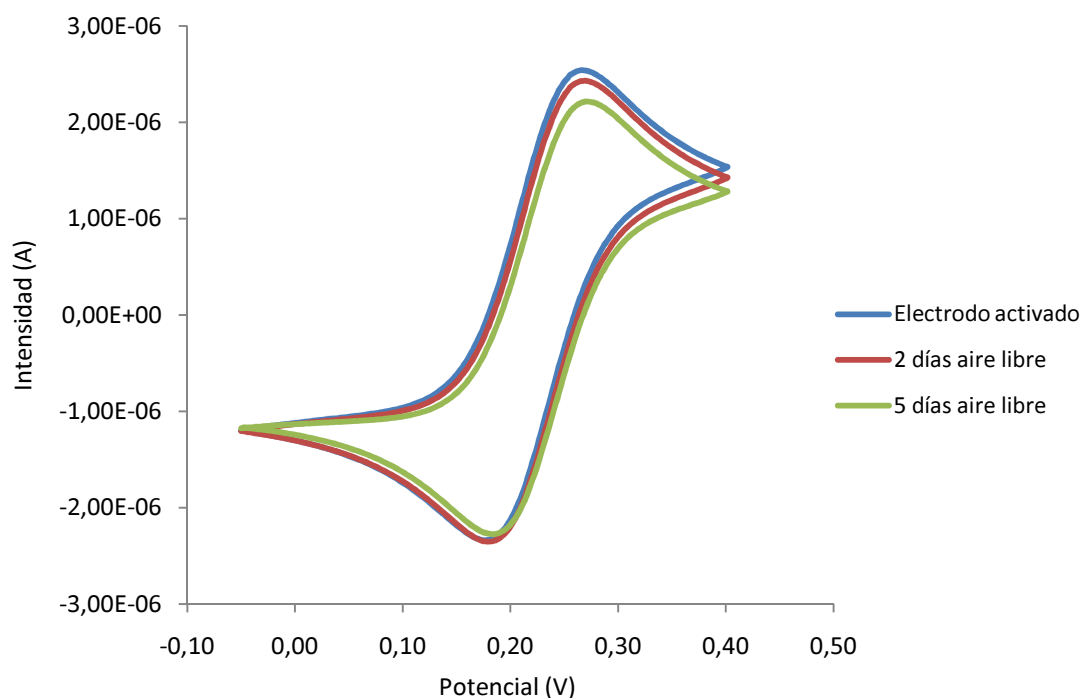
La pasivación por uso y/o conservación se verá influenciada por el medio en el que se encuentren los microelectrodos.

Con el fin de determinar la influencia del medio se analizó la pérdida de señal que experimentaban diferentes microelectrodos conservados en diferentes medios, a lo largo de 5 días.

Los medios utilizados fueron:

- Atmósfera inerte de nitrógeno
- Medio salino (KNO<sub>3</sub> 0.1M)
- Aire libre

Inicialmente se activaron los microelectrodos y se obtuvo el voltamperograma cíclico inicial para cada uno de los microelectrodos. A lo largo de los 5 días del estudio se realizaron voltamperogramas cíclicos a los 2 y 5 días (Fig 4.3.)



**Fig. 4.3.** Voltamperogramas cíclicos disolución  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  0.01M. Análisis evolución respuesta de un electrodo conservado al aire libre.

La evolución de la intensidad de la señal se evaluó mediante voltamperometría cíclica (ver 1.3.1.), comparando la media de los picos de intensidad catódico y anódico a lo largo de los días de estudio (Tablas 4.3, 4.4 y 4.5)

**Tabla 4.3.** Evolución señal microelectrodo conservado en atmósfera inerte  $\text{N}_2$ .

Nitrógeno	I promedio (A)	% pérdida sensibilidad
0 días	3,45E-06	0,00%
2 días	3,38E-06	2,13%
5 días	3,26E-06	5,67%

**Tabla 4.4.** Evolución señal microelectrodo conservado en medio salino  $\text{KNO}_3$ .

Medio Salino	I promedio (A)	% pérdida sensibilidad
0 días	3,39E-06	0,00%
2 días	3,37E-06	0,67%
5 días	3,07E-06	9,40%

**Tabla 4.5.** Evolución señal microelectrodo expuesto al aire ambiente.

Aire ambiente	I promedio (A)	% pérdida sensibilidad
0 días	3,16E-06	0,00%
2 días	2,98E-06	5,56%
5 días	2,76E-06	12,65%

Como se observa en las tablas 4.3 a 4.5, los cálculos concluyen que en cualquiera de los tres medios la señal se ve afectada por pasivación del electrodo. Si más no, el medio salino y el aire libre provocan una mayor pasivación del microelectrodo, afectando más a la reducción de la sensibilidad a lo largo del tiempo.

Se concluye así que es necesaria una activación del microelectrodo, mediante el protocolo adecuado, antes de cada uso con tal de obtener una señal representativa del electrodo, sea cual sea el medio de conservación.

En caso de no usar el microelectrodo durante un largo período de tiempo, se recomienda su conservación en atmósfera inerte de nitrógeno, puesto que es el medio menos pasivante de los sometidos a estudio.

#### 4.1.3. Caracterización de los MEAs 4x300µm de platino

La respuesta electroquímica de los microelectrodos ha sido evaluada mediante voltamperometría cíclica del par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ . Este par redox es ampliamente utilizado dado que sus propiedades electroquímicas son perfectamente conocidas, lo que permite evaluar la respuesta de nuestros microelectrodos comparándola con la respuesta ideal.

Tras la activación de los microelectrodos mediante el procedimiento establecido (ver 4.1.1.) se procede a su caracterización.

Los voltamperogramas obtenidos son analizados según determinado en el punto 1.3.1.1.

En la tabla 4.6 se muestran los resultados de intensidad de pico catódico ( $I_{pc}$ ), intensidad de pico anódico ( $I_{pa}$ ), su cociente y la separación entre los picos de oxidación y reducción obtenidos experimentalmente.

**Tabla 4.6.** Resultados obtenidos en la caracterización de los MEAs 4x300µm

$\Delta E_p$ (V) experimental	$I_{pc}$ (uA)	$I_{pa}$ (uA)	$I_{pc}/I_{pa}$
0,081	3,04	2,76	1,10
0,081	3,47	2,96	1,17
0,088	3,20	2,68	1,19
0,089	3,39	2,92	1,16
0,088	3,20	2,80	1,14
0,086	3,21	2,72	1,18
0,087	3,32	2,82	1,18
0,089	3,20	2,84	1,13



Como se puede observar en la tabla 4.6. la separación de picos es en promedio de 86 mV, no muy lejanos a los 59 mV teóricos para este par redox, indicando una correcta transferencia electrónica.

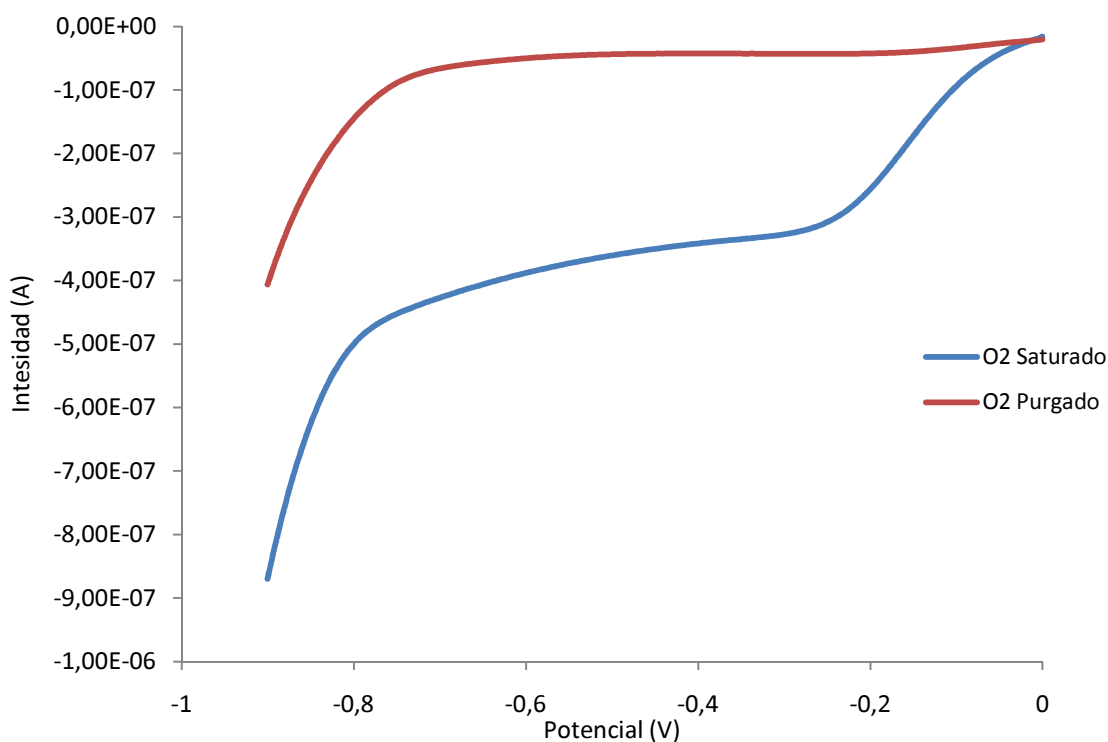
Las intensidades de pico son muy similares entre diferentes electrodos, presentado desviaciones de entre un 3% y un 4%, demostrando una gran homogeneidad entre los electrodos. Esto indica una correcta fabricación y activación de los microelectrodos.

Por último, el cociente de intensidades es siempre cercano a la unidad, algo mayor en todos los casos, atribuible al diferente coeficiente de difusión de los dos iones del par.

#### 4.1.4. Calibración de los MEAs 4x300µm como sondas de oxígeno disuelto

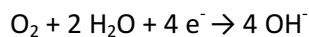
La finalidad última de este proyecto consiste en la utilización de estos microelectrodos de tecnología CMOS como sondas capaces de medir la concentración oxígeno disuelto.

Con tal de verificar la viabilidad del proyecto, primeramente se analizó la respuesta del electrodo, mediante *linear sweep*, ante una disolución conductora (KNO<sub>3</sub> 0.1M) saturada en oxígeno y una purgada de oxígeno.

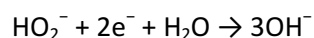
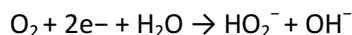


**Fig. 4.4.** Comparación voltamperogramas linear sweep en disolución saturada y purgada de oxígeno.

La reacción de reducción de oxígeno, en un medio de pH neutro o básico, corresponde a la siguiente:



Si más no, el mecanismo global es algo más complejo y hace posible diferenciar dos reacciones de reducción encadenadas:



Por esto, sería de esperar la visualización de dos picos de intensidad en el voltamperograma obtenido.

En la figura 4.4. se observa claramente el pico correspondiente a la primera de las reacciones de reducción pero no se distingue el segundo. Esta reacción debería suceder de forma espontánea alrededor de los -0.8 V (del Campo, et al., 2007), pero queda enmascarada por la formación de hidrógeno en la superficie del electrodo, como comprobaremos más adelante.

Aunque se den las dos reacciones diferenciadas, todas las medidas realizadas en este proyecto para la calibración de los microelectrodos corresponden a la reacción de reducción completa. De este modo, se escogió como potencial de medida -0.75 V (vs Ag/AgCl 3M).

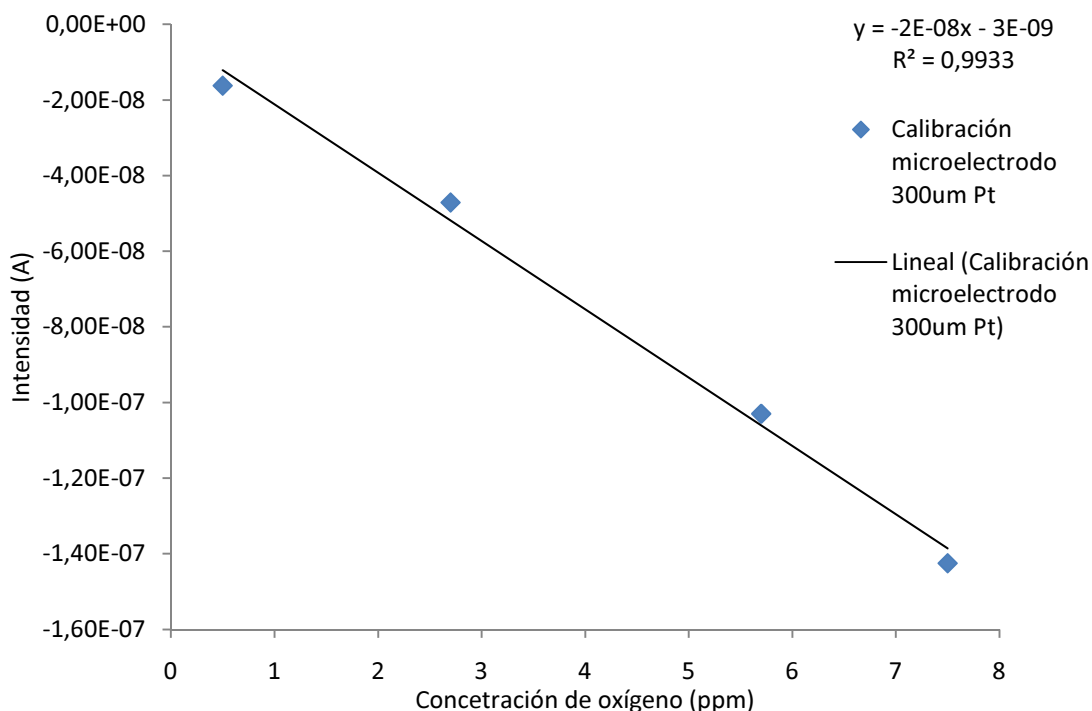
Una vez escogido el potencial de medida a tenor de los resultados obtenidos mediante el linear sweep, se evaluó la evolución de la respuesta de los microelectrodos a diversas concentraciones de oxígeno.

El protocolo se basó en purgar todo el oxígeno disuelto en el medio mediante burbujeo de nitrógeno gas e ir haciendo medidas mediante cronoamperometría de la respuesta del electrodo a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, mientras aumentaba por equilibrio con el oxígeno ambiente, con tal de comprobar la relación entre señal y concentración.

La concentración de oxígeno se comprobaba mediante una sonda comercial.

Con la finalidad de correlacionar la señal obtenida y la concentración de oxígeno, se representaron los valores obtenidos experimentalmente.

Como se observa en la figura 4.5. la evolución de la respuesta respecto a la concentración se ajusta perfectamente a un modelo de regresión lineal, en que la intensidad es directamente proporcional a la concentración del analito.



**Fig. 4.5.** Representación gráfica de la señal obtenida mediante cronoamperometría de un electrodo de Pt de 300µm a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto y regresión lineal.

En la tabla 4.7. se muestran las regresiones lineales obtenidas en la calibración como sondas de oxígeno de diferentes microelectrodos de Pt de 300µm

**Tabla 4.7.** Resultados de la calibración de los microelectrodos de Pt de 300µm.

Sensibilidad (nA/ppm)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>
-18,06	-3,15	0,99
-17,22	0,00	0,97
-18,16	1,56	0,97
-18,03	0,46	0,98

Como se observa en la tabla 4.7. las sensibilidades entre los microelectrodos son homogéneas, presentando variaciones de un 2,5% entre microelectrodos.

Se observa una clara correlación lineal entre señal y concentración del analito, con coeficientes de correlación superiores a 0.97 en todos los casos.

En cualquier caso se observan diferencias en la ordenada en el origen, es decir, en la corriente registrada para una concentración virtualmente nula de oxígeno. Es por esto, además de por cambios en la sensibilidad, que es recomendable realizar el calibrado de los microelectrodos de forma individual con tal de obtener la máxima exactitud en las medidas.

La señal obtenida para un microelectrodo se puede aproximar de forma teórica mediante la siguiente ecuación:

$$I_{\text{teórica}} = \frac{4 \cdot n \cdot F \cdot D \cdot c \cdot r}{\frac{4 \cdot L}{\pi \cdot r} + 1}$$

Donde,

n = número de electrones que intervienen en la reacción

F = constante de Faraday = 96485 C·mol<sup>-1</sup>

D = coeficiente de difusión

c = concentración del analito

r = radio del electrodo

L = altura de la pasivación

De este modo se puede aproximar la sensibilidad del electrodo, dividiendo la señal obtenida por la concentración del analito.

En nuestro caso, considerando un coeficiente de difusión del oxígeno de  $2.2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , un radio del electrodo equivalente de 169.26  $\mu\text{m}$  y aplicando la corrección para electrodos no planares, con una profundidad de pasivación L= 1  $\mu\text{m}$ , podemos aproximar:

**Tabla 4.8.** Comparación sensibilidad teórica y promedio experimental.

Sensibilidad teórica (uA/ppm)	Sensibilidad promedio (uA/ppm)	Desviación
17,83	17,87	0,22%

Como se observa en la tabla 4.8., los resultados experimentales se ajustan satisfactoriamente a la predicción teórica.

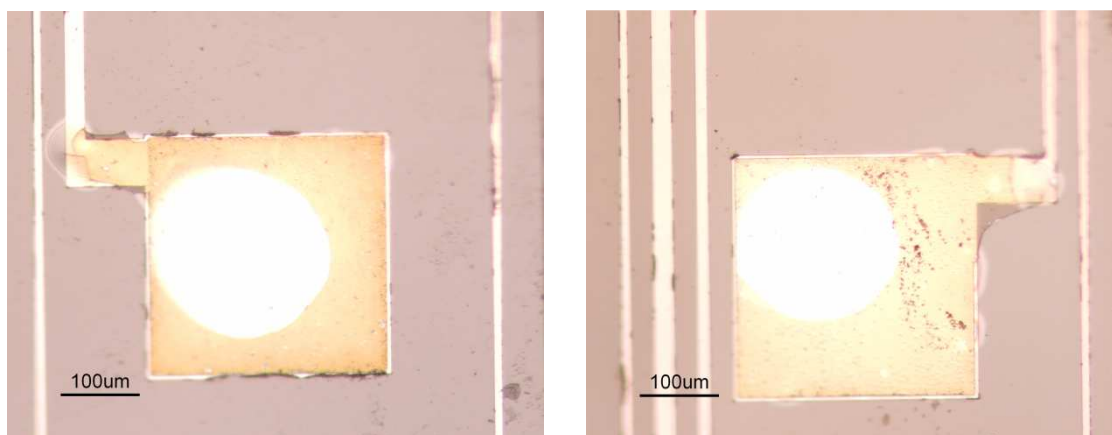
#### 4.1.5. Diseño de un protocolo de orificación galvánica de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$

Como se ha referido anteriormente (en la sección 3.3.3.) la orificación de los microelectrodos de platino aporta diversas ventajas, como son la obtención de una mayor área efectiva, facilitando el intercambio de carga con el analito, y una mayor ventana de potenciales de trabajo (ver 4.1.7.).

Con la finalidad de obtener un protocolo de orificación estándar para los microelectrodos, se han evaluado la influencia de los diferentes parámetros del proceso en la orificación mediante medidas de impedancia.

Inicialmente, partiendo de experiencias anteriores, se fijó una intensidad de corriente de 25uA y un tiempo de 60s.

Las orificaciones obtenidas, como se muestra en la figura 4.6., presentaban una zona circular sobre la cual no se electrodepositaba el oro.



**Fig. 4.6.** Imágenes microscopio electrodos orificados sin agitación.

Estos defectos en la orificación se deben a que los potenciales de celda que se alcanzan durante el proceso galvánico son suficientes como para generar hidrógeno sobre la superficie del electrodo. Este gas queda adherido sobre el electrodo, formando una burbuja que impide la electrodeposición del metal en esa zona.

Con tal de evitar este inconveniente y conseguir una superficie perfectamente orificada, se implementó una punta de ultrasonidos programable en el montaje (ver 3.2 B). La programación de los pulsos de ultrasonidos no es crítica en el proceso de orificación, con tal de que sean suficientemente seguidos y con la intensidad necesaria para arrancar la burbuja adherida en la superficie.

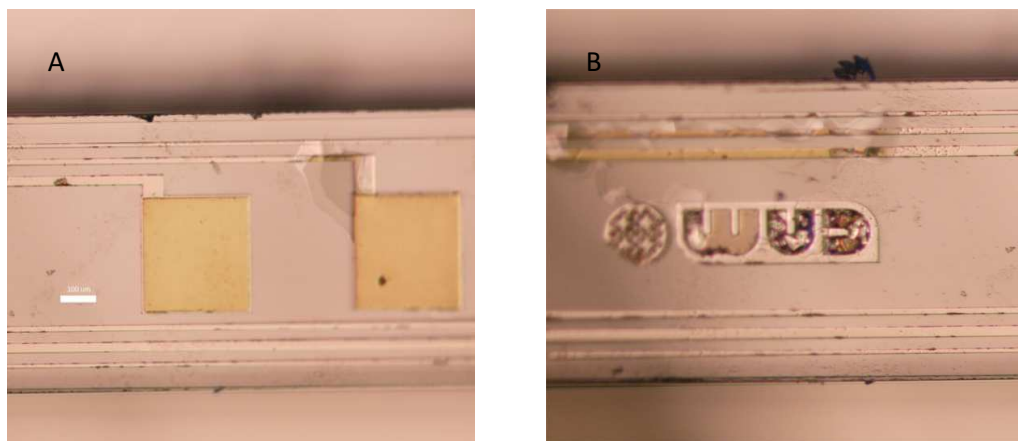
En el presente trabajo se programó la punta de ultrasonidos de tal manera que generaba pulsos de 1s de duración cada 5s.

Se probaron variaciones en los parámetros de intensidad y tiempo de orificación, obteniéndose resultados óptimos de impedancia en las siguientes condiciones:

- Intensidad de corriente: -20  $\mu$ A
- Tiempo: 100 s

Como se observa en la figura 4.7., mediante este protocolo de orificación, gracias a la implementación de la punta de ultrasonidos, se obtienen orificaciones homogéneas de la superficie del microelectrodo.

En algunos MEA se observó orificación sobre las pistas de los electrodos (fig 4.7. derecha), debido a que la pasivación se encontraba levantada. Esto se solventó modificando el protocolo de activación (tal y como se detalla en la sección 4.1.1.)



**Fig. 4.7.** A: Imagen microscopio óptico de electrodos orificados homogéneamente. B: detalle de un MEA con pistas orificadas por levantamiento de la pasivación.

#### 4.1.6. Caracterización de los MEAs 3x300 $\mu\text{m}$ orificados

Del mismo modo que se han caracterizado los microelectrodos de platino (ver 4.1.3.) se ha procedido con los microelectrodos modificados con oro electrodepositado.

En la tabla 4.9. se detallan los resultados obtenidos de la caracterización mediante voltamperometría cíclica.

**Tabla 4.9.** Resultados caracterización MEAs 4x300 $\mu\text{m}$  orificados.

$\Delta E_p$ (V) experimental	$I_{pc}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{pa}$ (A)	$I_{pc}/I_{pa}$
0,09	3,10	2,58	1,20
0,11	3,82	3,11	1,23
0,09	3,49	2,82	1,24
0,11	4,24	3,40	1,25
0,10	3,38	2,74	1,23
0,10	4,23	3,47	1,22

Con respecto a los microelectrodos de platino (Tabla 4.6.), se observa un aumento de la señal obtenida de aproximadamente un 10%, lo que representaría un 10% de aumento de la superficie efectiva del electrodo, a causa del aumento de rugosidad de ésta.

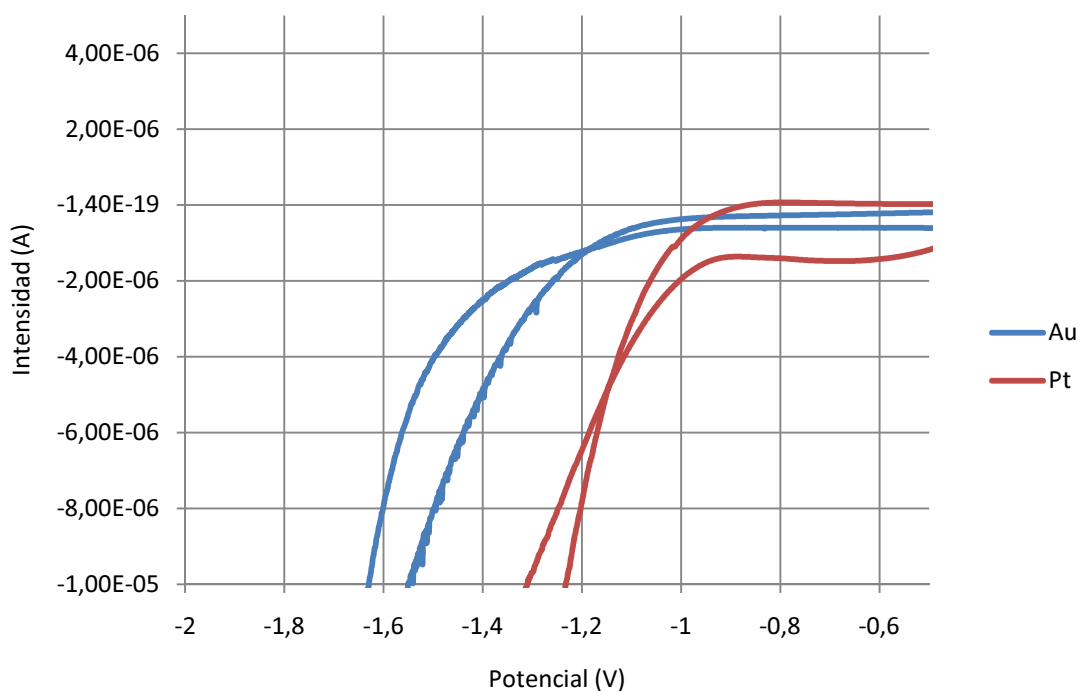
#### 4.1.7. Comparación del rango de trabajo entre MEAs 4x300µm de platino y orificados

La ventana de trabajo de un microelectrodo queda definida entre los potenciales para los cuales la intensidad de corriente generada por especies que no son el analito no enmascare la señal de éste.

En el caso que nos ocupa, nos interesa hacer medidas a potenciales suficientemente negativos como para que la reacción de reducción del oxígeno se haya dado por completo, pero sin ser enmascarada por la formación de hidrógeno.

Se conoce que el platino actúa como catalizador en la reacción de reducción del hidrógeno, lo que disminuirá el potencial necesario para su formación, reduciendo la ventana de trabajo y pudiendo interferir en la señal de nuestro analito de interés.

Esto se ha analizado mediante voltamperometría cíclica, entre los potenciales -2 V y +2 V, comparando la respuesta de un microelectrodo de platino respecto a un electrodo cuya superficie ha sido orificada (Fig 4.8.)



**Fig 4.8.** Detalle curva hidrodinámica. Comparación rango de trabajo de un electrodo de platino respecto a uno orificado.

Como se observa en la figura 4.8, la señal del microelectrodo orificado se mantiene estable más allá de -1 V, mientras que la de platino se ve afectada por la formación de hidrógeno mucho antes.

Puesto que las medidas de oxígeno las realizamos a -0.75 V, es preferible el uso de los microelectrodos orificados, pues permiten más margen de seguridad.

#### 4.1.8. Comparación de la funcionalidad como sensores de oxígeno de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$ de platino, orificados y recubiertos con pHEMA

De forma análoga a la metodología de la calibración realizada para los electrodos de platino (ver sección 4.1.4.), se han realizado calibrados para los microelectrodos modificados por electrodeposición de oro.

Los resultados de las calibraciones de los microelectrodos con oro electrodepositado se muestran en la tabla 4.10:

**Tabla 4.10.** Resultados de la calibración para oxígeno disuelto de los microelectrodos orificados.

Sensibilidad (nA/ppm)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>
-24,30	16,60	0,991
-24,74	18,59	0,990
-22,67	14,55	0,996
-26,05	18,60	0,996

La capa de oro electrodepositado ha sido protegida mediante el hidrogel pHEMA, tal y como se detalla en la sección 3.3.4. con la finalidad de hacerla mecánicamente más resistente, dificultando su desprendimiento de la superficie del microelectrodo.

La capa de hidrogel es de un grosor de pocos nanómetros, lo que no debería interferir en la respuesta electroquímica del electrodo.

Los resultados de las calibraciones de los microelectrodos orificados protegidos con pHEMA se muestran en la tabla 4.11:

**Tabla 4.11.** Resultados de la calibración para oxígeno disuelto de los microelectrodos orificados recubiertos con el hidrogel pHEMA.

Sensibilidad (nA/ppm)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>
-26,58	17,61	0,999
-29,31	-78,68	0,992
-24,80	9,47	0,999
-25,59	1,32	0,986

Como se puede observar en las tablas anteriores la sensibilidad del electrodo no se ve afectada por efecto de la capa de pHEMA puesto que la capa de hidrogel es de un grosor de pocos nanómetros, por lo que no interfiere en la respuesta electroquímica del electrodo.

En general, del mismo modo que se había observado mediante voltamperometría cíclica del par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  en las caracterizaciones de los microelectrodos, al modificar la naturaleza de la superficie mediante la electrodeposición de oro se observa un aumento de la sensibilidad de éste, como se detalla en la tabla 4.12



**Tabla 4.12.** Resumen promedio sensibilidad para los microelectrodos de Pt, orificados y con pHEMA.

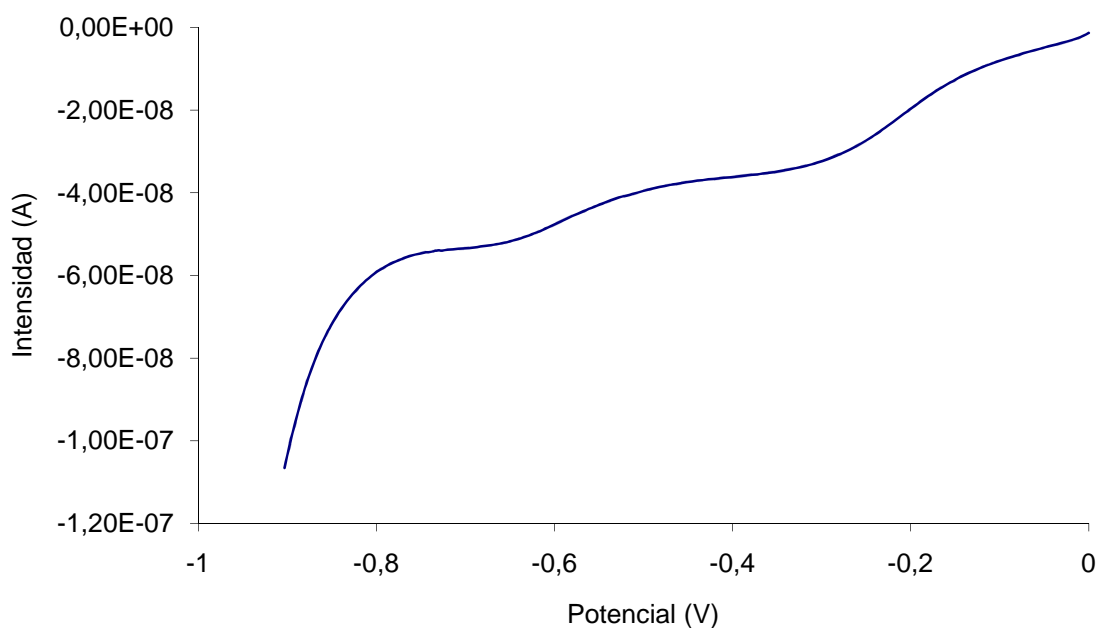
Sensibilidad Pt promedio (nA/ppm)	Sensibilidad Au promedio (nA/ppm)	Sensibilidad Au+pHEMA promedio (nA/ppm)
-17,87	-24,44	-26,57

En la caracterización de los microelectrodos se había observado un aumento de un 10% en la sensibilidad de los electrodos para el par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ . En el caso de la sensibilidad al oxígeno disuelto se observa un aumento de entre un 37 y un 49% a favor de los electrodos modificados.

Este importante aumento se puede achacar a dos causas principalmente:

- El aumento de la rugosidad de la superficie facilita el intercambio de cargas con el analito. El aumento debido a este fenómeno se ha estimado en un 10% de aumento de la sensibilidad de acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización (ver sección 4.1.6).
- La modificación de la naturaleza de la superficie evita la formación de hidrógeno al potencial de medida. La formación de burbujas de hidrógeno sobre la superficie del electrodo puede actuar de pasivante temporal sobre éste, dificultando la difusión de nuestro analito de interés hasta la superficie del mismo e introduciendo variabilidad en las medidas.

Este último punto se ve reflejado al realizar un voltamperograma mediante linear sweep con un electrodo orificado (Fig 4.9.)

**Fig 4.9.** Voltamperograma linear sweep en medio salino  $\text{KNO}_3$  0.1M, mediante un electrodo orificado.

Como se observa en la figura 4.9., en el caso de los electrodos orificados se observan perfectamente los dos picos de reducción correspondientes a las semirreacciones de reducción del oxígeno.

El detalle del segundo pico no era visible en el caso de los microelectrodos de platino, pues quedaba enmascarado por la formación de hidrógeno (Fig 4.4.)

#### 4.1.9. Análisis de estabilidad de los calibrados de los MEAs 4x300 $\mu\text{m}$

Es interesante el uso de este tipo de microelectrodos como sondas de oxígeno implementadas en equipos industriales permitiendo medidas en continuo del proceso. Para esta finalidad es de suma importancia conocer la evolución de la respuesta del sensor a lo largo del tiempo de trabajo.

Como visto anteriormente (en la sección 4.1.2.) las condiciones del medio en que se encuentra afectan a la respuesta del microelectrodo a lo largo del tiempo debido a la pasivación de su superficie.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la pasivación por uso en continuo del electrodo sobre la sensibilidad en la medida de oxígeno disuelto se elaboró un experimental en el que se realizaron 3 calibrados de los microelectrodos a lo largo de un día de trabajo, manteniendo los electrodos sumergidos en el medio salino en todo momento.

Estas pruebas se llevaron a cabo tanto con electrodos de platino como con electrodos orificados y recubiertos con pHEMA, con tal de valorar la influencia de las modificaciones sobre la estabilidad del calibrado.

Los resultados de estabilidad asociados a los diferentes microelectrodos se detallan a continuación en las tablas 4.13 a 4.15.

**Tabla 4.13.** Resultados del análisis de la estabilidad de la sensibilidad para medidas en continuo con electrodos de platino

Electrodo	Tiempo (h)	Sensibilidad (nA/ppm)	Error asociado a la sensibilidad (nA/ppm)	R <sup>2</sup>	Pérdida de sensibilidad
1 Pt	0	-18,03	8,07	0,98	0,00%
1 Pt	3	-17,57	7,22	0,98	2,52%
1 Pt	7	-13,37	5,07	0,98	25,82%
2 Pt	0	-17,22	9,04	0,97	0,00%
2 Pt	3	-16,33	6,29	0,98	5,16%
2 Pt	7	-13,98	5,01	0,99	18,79%
3 Pt	0	-18,06	4,53	0,99	0,00%
3 Pt	3	-17,90	5,29	0,99	0,88%
3 Pt	7	-14,85	6,70	0,98	17,80%

Como se observa en la tabla 4.13, a lo largo de las 7 horas de experimental se produjo una disminución de aproximadamente un 20% de la señal. Cabe destacar que la disminución de la

sensibilidad no se produjo de forma progresiva, si no que se mantuvo estable durante las primeras horas y disminuyó sensiblemente en las últimas.

**Tabla 4.14.** Resultados del análisis de la estabilidad de la sensibilidad para medidas en continuo con electrodos orificados

Electrodo	Tiempo (h)	Sensibilidad (nA/ppm)	Error asociado a la sensibilidad (nA/ppm)	R <sup>2</sup>	Pérdida de sensibilidad
1 Au	0	-24,74	7,46	0,990	0,00%
1 Au	3	-18,47	3,86	0,995	25,35%
1 Au	7	-15,15	3,19	0,995	38,74%
2 Au	0	-22,67	4,42	0,996	0,00%
2 Au	3	-16,99	1,92	0,999	25,06%
2 Au	7	-14,95	1,55	0,999	34,03%
3 Au	0	-26,05	4,83	0,996	0,00%
3 Au	3	-18,47	6,40	0,987	29,11%
3 Au	7	-16,44	1,86	0,999	36,90%

En el caso de los microelectrodos cuya superficie se encuentra modificada por electrodeposición de oro se observó una disminución de la sensibilidad de en torno a un 36%. En este caso la pasivación del microelectrodo se produjo principalmente durante las primeras horas del experimental, afectando en torno a un 26% en la sensibilidad durante las 3 primeras horas.

**Tabla 4.15.** Resultados del análisis de la estabilidad de la sensibilidad para medidas en continuo con electrodos orificados y recubiertos con el hidrogel pHEMA

Electrodo	Tiempo (h)	Sensibilidad (nA/ppm)	Error asociado a la sensibilidad (nA/ppm)	R <sup>2</sup>	Pérdida de sensibilidad
1 pHEMA	0	-25,59	9,32	0,986	0,00%
1 pHEMA	3	-24,99	15,54	0,998	2,35%
1 pHEMA	7	-25,28	1,46	1,000	1,22%
2 pHEMA	0	-24,80	2,09	0,999	0,00%
2 pHEMA	3	-23,11	8,79	0,999	6,83%
2 pHEMA	7	-22,05	4,24	0,996	11,10%
3 pHEMA	0	-26,58	6,92	1,000	0,00%
3 pHEMA	3	-23,57	14,22	0,998	11,32%
3 pHEMA	7	-21,85	1,99	0,999	17,79%

Para los microelectrodos a los que se aplicó el hidrogel pHEMA se obtuvo una reducción promedio de un 10% de la señal, de un 18% en el peor de los casos. En general la pasivación se produjo de forma progresiva a lo largo del experimental.

Las diferencias de estabilidad entre los microelectrodos de platino y los orificados, se pueden deber principalmente a que el aumento de la rugosidad de la superficie conlleva que ésta sea más susceptible de que compuestos pasivantes se depositen sobre ella.

En el caso de los microelectrodos protegidos con pHEMA se observa una estabilidad mucho mayor en la sensibilidad del microelectrodo. Esto es debido a que las características del hidrogel dificultan la adherencia sobre la superficie del microelectrodo, haciéndola mucho más resistente a la pasivación.

Se concluye de este experimental que la mejor respuesta y estabilidad del sensor se obtiene para los electrodos de oro protegidos con pHEMA.

#### **4.2. MEAs de 4x120 $\mu\text{m}$**

Fruto de la experiencia obtenida en el trabajo con los microelectrodos de 300  $\mu\text{m}$ , se ha decidido trabajar directamente con electrodos orificados, puesto que presentan una mayor sensibilidad en la medición de oxígeno disuelto y una mejor correlación lineal en los calibrados.

##### **4.2.1. Acondicionamiento de los MEAs de 4x120 $\mu\text{m}$**

Análogamente al esquema seguido con los microelectrodos de 300 $\mu\text{m}$  se ha procedido a diseñar un protocolo de activación, un protocolo de orificación y se ha hecho la caracterización electroquímica de los microelectrodos mediante voltamperometría cíclica.

- **Protocolo de activación de los MEAs de 120  $\mu\text{m}$**

Partiendo de la experiencia obtenida en el diseño experimental del protocolo de activación en los microelectrodos de 300 $\mu\text{m}$ , se partió del protocolo de activación mediante voltamperometría cíclica (tabla 4.2), evaluando la respuesta del electrodo mediante voltamperometría cíclica del par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ .

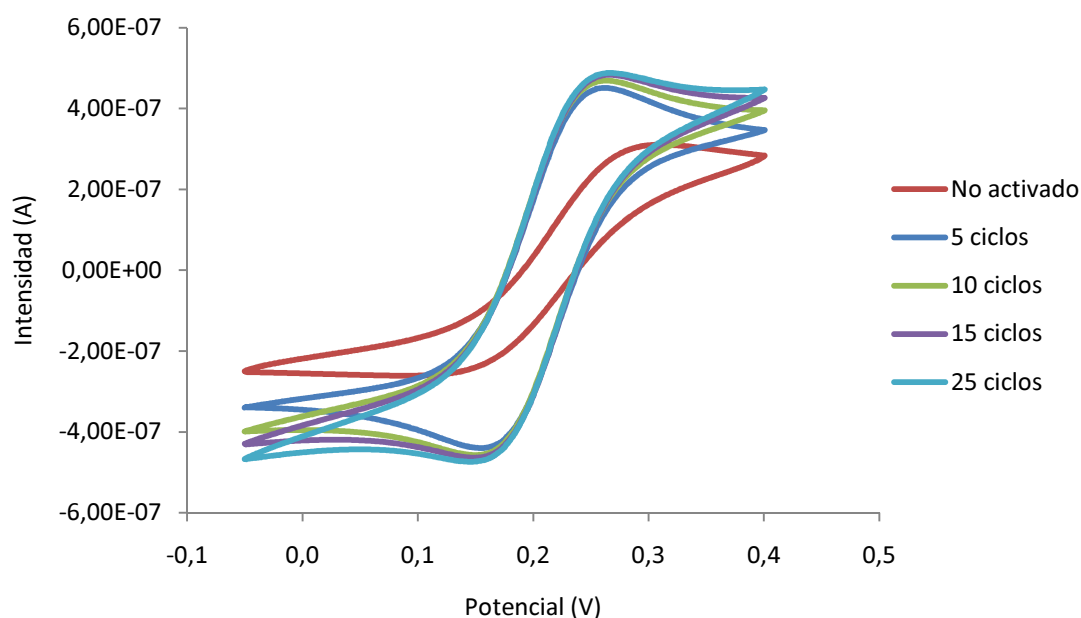
El límite de corriente se estableció en 10 $\mu\text{A}$ , dando lugar a una densidad de corriente en la superficie del electrodo de 694  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , algo inferior a los 1111  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  que se daban en los microelectrodos de 300 $\mu\text{m}$ .

La evolución de la respuesta del electrodo tras diversos ciclos de activación se observa en la figura 4.10. Se estableció que los electrodos quedan perfectamente activados tras 15 ciclos de activación.

A tenor de los resultados se estableció el protocolo de activación especificado en la tabla 4.16:

**Tabla 4.16.** Protocolo activación microelectrodos de 120 $\mu$ m.

Técnica	Cronoamperometría
$E_1$	-2 V
Tiempo $E_1$	10 s
$E_2$	0 V
Tiempo $E_2$	5 s
Escalones	15



**Fig. 4.10.** Voltamperogramas cíclicos de un microelectrodo de 120  $\mu$ m para diversos ciclos de activación mediante cronoamperometría.

- **Protocolo de orificación de los MEAs de 120  $\mu$ m**

Partiendo del protocolo de orificación diseñado para los microelectrodos de 300  $\mu$ m, se adaptó la intensidad de corriente acorde a la reducción del área, obteniéndose orificaciones óptimas con los siguientes parámetros:

- Intensidad de corriente: -4  $\mu$ A
- Tiempo: 100 s

Posterior a la orificación se procedió al recubrimiento de la superficie de los microelectrodos con el hidrogel pHEMA, con el fin de aprovechar las ventajas experimentadas en los microelectrodos de 300  $\mu$ m.

#### 4.2.2. Caracterización de los MEAs de 120 $\mu\text{m}$ orificados

Con los electrodos perfectamente activados se procedió a su caracterización electroquímica, mediante el análisis de los voltamperogramas cíclicos del par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , análogamente a los electrodos de 300  $\mu\text{m}$ .

Los resultados obtenidos en la caracterización se pueden observar en la tabla 4.17:

**Tabla 4.17.** Resultados caracterización microelectrodos 120 $\mu\text{m}$  orificados

$\Delta E_p$ (V) experimental	$I_{pc}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{pa}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{pc}/I_{pa}$
0,11	0,79	0,74	1,08
0,11	0,78	0,75	1,04
0,10	0,70	0,64	1,10
0,10	0,67	0,58	1,14
0,11	0,68	0,55	1,24
0,12	0,73	0,64	1,14

En el caso de los microelectrodos de 300  $\mu\text{m}$  orificados obtuvimos una intensidad de pico promedio de 3,70  $\mu\text{A}$ . Teniendo en cuenta la relación de áreas entre los microelectrodos, la intensidad de pico promedio esperable para éstos electrodos debería ser 6.25 veces menor, es decir, de 0.60  $\mu\text{A}$ .

La intensidad de pico observada (tabla 4.17) resulta ser 0.69, un 13% superior a lo esperable por su relación geométrica. En esto pueden influir tanto la nueva configuración de la celda, gracias al nuevo diseño de estos MEA con la pcb rígida, como la mejora de la difusión asociada a la disminución de la escala del microelectrodo (ver fig 1.2.)

#### 4.2.3. Calibración como sensores de oxígeno de los microelectrodos orificados y recubiertos con pHEMA

Análogamente a como se procedió con los microelectrodos de 300 $\mu\text{m}$ , se realizó una calibración de los microelectrodos con tal de evaluar su respuesta como sensores de oxígeno y se estudió la evolución de la sensibilidad a lo largo de un día de trabajo.

Los resultados de las calibraciones y su evolución en el tiempo se detallan en las tablas 4.18 y 4.19.

**Tabla 4.18.** Valores calibrado y evolución en el tiempo microelectrodo de 120um orificado

Electrodo	Tiempo (h)	Sensibilidad (nA/ppm)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>	Pérdida de sensibilidad
1 Au	0	-7,19	4,39	0,995	0,00%
1 Au	3	-6,21	2,77	0,995	13,60%
1 Au	7	-5,40	0,61	0,994	24,86%
2 Au	0	-7,16	5,01	0,987	0,00%
2 Au	3	-5,65	2,69	0,995	21,18%
2 Au	7	-4,41	-0,24	0,978	38,39%
3 Au	0	-7,11	3,93	0,985	0,00%
3 Au	3	-5,66	2,33	0,997	20,42%
3 Au	7	-4,59	-0,63	0,989	35,44%

**Tabla 4.19.** Valores calibrado y evolución en el tiempo microelectrodo de 120um orificado y recubierto con hidrogel pHEMA.

Electrodo	Tiempo (h)	Sensibilidad (nA/ppm)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>	Pérdida de sensibilidad
1 pHEMA	0	-6,70	-2,97	0,997	0,00%
1 pHEMA	3	-6,08	-2,08	0,999	9,25%
1 pHEMA	7	-5,80	-1,98	0,997	13,45%
2 pHEMA	0	-6,96	-3,22	0,997	0,00%
2 pHEMA	3	-6,30	-0,86	0,998	9,51%
2 pHEMA	7	-6,07	-2,87	0,998	12,71%
3 pHEMA	0	-6,19	-4,68	0,996	0,00%
3 pHEMA	3	-5,79	-3,06	0,995	6,48%
3 pHEMA	7	-5,44	-3,14	0,991	12,02%

Como se observa en las tablas anteriores, la sensibilidad de calibración se encuentra en torno a 7 nA/ppm; en comparación con los microelectrodos de 300um, que se obtuvieron sensibilidades en torno a 25 um, y teniendo en cuenta la disminución del área esta sensibilidad es un 75% mayor en relación por unidad de área.

Ya habíamos observado este aumento relativo en la señal a la hora de caracterizar los microelectrodos, pero resulta mucho más acusado en el caso de las medidas de oxígeno.

Esto probablemente esté relacionado con las concentraciones mucho menores de analito que se dan en el oxígeno, lo cual influye directamente en el efecto limitante de la difusión sobre la intensidad de corriente medida.

Observamos de nuevo una evolución muy similar de la señal a lo largo de un día de trabajo, una pérdida en torno al 30% de la señal en el caso de los microelectrodos orificados y poco más de un 10% en el caso de los que han sido modificados con la capa de hidrogel pHEMA, gracias a su efecto antipasivante.

#### 4.2.4. Medidas de oxígeno en biomasa con MEAs de 4x120µm

Como referido en los objetivos, la finalidad global de este estudio era la aplicación de estos microelectrodos como sondas capaces de medir la concentración de oxígeno en el interior de gránulos de biomasa.

Tras la completa caracterización, diseño de protocolos y determinación de las mejores condiciones de medida para estos microelectrodos, se procedió a verificar la viabilidad final de la aplicación.

##### 4.2.4.1. Medidas de oxígeno en el medio salino del reactor

Con tal de verificar la posible influencia del medio sobre la sensibilidad de los microelectrodos, se realizaron calibrados de oxígeno utilizando este medio.

Hasta este momento el medio utilizado había sido una solución salina de KNO<sub>3</sub> 0.1M. Esta sal actúa como electrolito soporte, aportando conductividad al medio y facilitando la circulación de cargas, algo básico si queremos evaluar electroquímicamente la muestra.

Se extrajo medio salino del reactor y se analizó para conocer su composición, resultando ser un medio muy pobre en sales (menos de 200mg/l – aproximadamente 0.005 M) en comparación al empleado hasta el momento.

La baja concentración en sales podría dificultar las medidas de cronoamperometría, al tratarse de un medio de muy baja conductividad.

**Tabla 4.19.** Resultados calibrado como sondas de oxígeno. Electrodo de 120µm, medio salino del reactor.

Sensibilidad (nA/ppm)	Ordenada en el origen (nA)	R <sup>2</sup>
-3,98	-2,83	0,992
-3,62	-3,39	0,994
-4,46	-6,05	0,986

Como se observa en la tabla 4.19. en el medio de baja conductividad se vio ligeramente disminuida la sensibilidad del microelectrodo, sin embargo la correlación lineal de las calibraciones es satisfactoria.

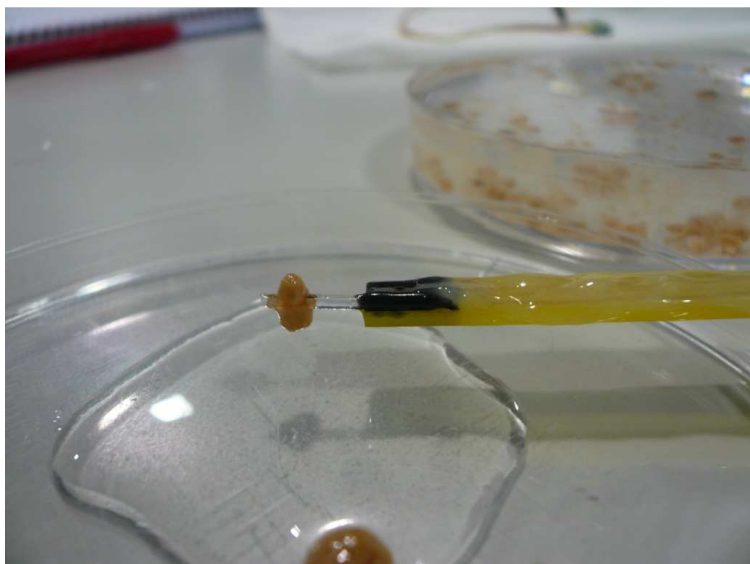
Se concluye de esta prueba la viabilidad de la implementación del microelectrodo como sonda de oxígeno en el reactor, previa calibración del sensor en este medio.



#### 4.2.4.2. Perfil de oxígeno en gránulo de biomasa

Tras la verificación de la viabilidad de los microelectrodos como sondas de oxígeno en el medio del reactor se procedió a realizar medidas en el interior de uno de los gránulos de biomasa con la finalidad de determinar la distribución de oxígeno que se da dentro de su estructura.

El gránulo se atravesó con uno de los MEA (fig 4.11.), y se utilizaron los 4 microelectrodos de éste como puntos de medida a diferentes profundidades del gránulo.



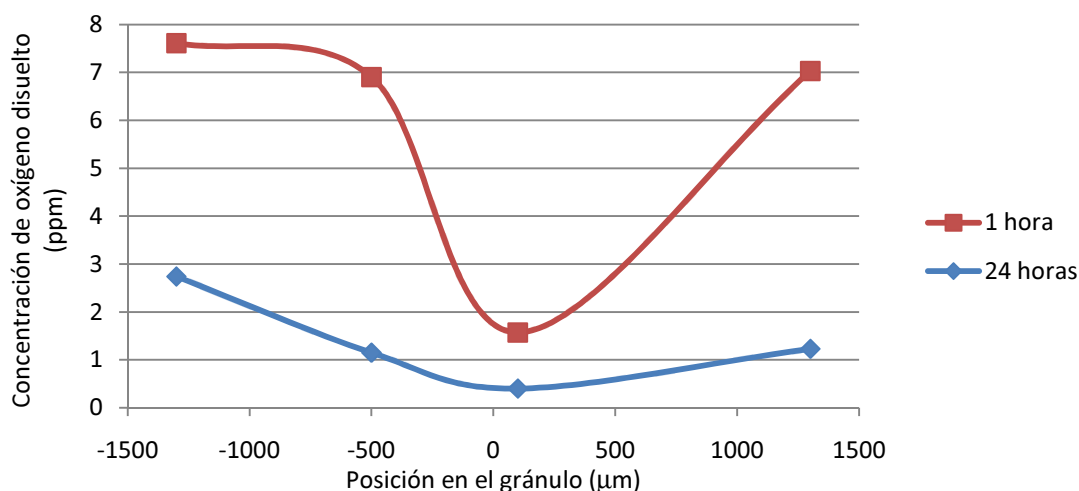
**Fig. 4.11.** MEA de 4x120um atravesando un gránulo de biomasa para elaborar perfil de la distribución de oxígeno en el interior del gránulo.

El gránulo se introdujo en la solución salina del reactor, añadiendo 60 mg/L de cloruro de amonio, con el objetivo de garantizar la actividad de los microorganismos nitrificantes.

La concentración de oxígeno del medio se midió mediante la sonda comercial, siendo de 7.5 ppm.

El gránulo se dejó sumergido en el medio durante una hora, tras lo que se realizaron las primeras medidas de oxígeno mediante cronoamperometría, que se repitieron tras 24 horas.

Los resultados del perfil de oxígeno se pueden observar en el gráfico de la figura 4.12.



**Figura 4.12.** Distribución de oxígeno en el interior de la biomasa. El eje horizontal representa los 4 puntos de medida del MEA en el interior del gránulo, siendo el punto 0 el centro del gránulo.

Como se observa en el gráfico anterior, tras 1 hora se muestra claramente el efecto de la difusión del oxígeno a través de la biomasa. En los extremos del gránulo la concentración resulta muy similar a la del medio, mientras que en el interior del gránulo ésta es muy inferior.

Tras 24 horas la concentración de oxígeno presenta el mismo tipo de perfil anterior, con una concentración mayor en los extremos e inferior en el centro, a causa de la difusión. Sin embargo se ha reducido considerablemente la concentración de oxígeno en todas las zonas, llegando a condiciones prácticamente anóxicas hacia el interior del gránulo.

Esta reducción drástica de la concentración de oxígeno tras las 24 horas se debe al consumo por parte de los microorganismos del oxígeno que había en la cavidad formada entre el microelectrodo y el gránulo de biomasa.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir la viabilidad de la medida de la concentración de oxígeno disuelto en el interior de biopelículas biológicas aunque la configuración de los MEAs utilizados limitan la calidad de la información obtenida en cuanto a la cantidad de datos a lo largo del grosor de la biopelícula.

#### 4.3. Diseño de nuevos MEA

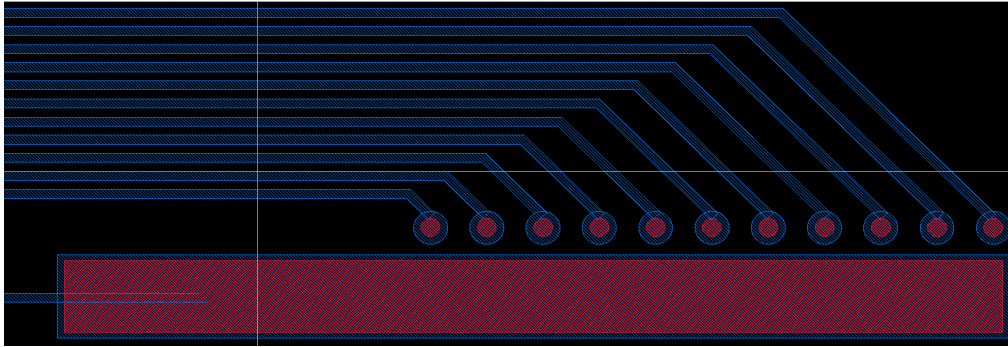
A partir de la experiencia obtenida y pensando en el objetivo de la obtención de un perfil detallado de la distribución de oxígeno en el interior de los gránulos de biomasa se diseñaron unos nuevos MEA que reunieran las características idóneas.

Los principales puntos que se tuvieron en cuenta en el diseño de estos MEA fueron los siguientes:

- Fabricación de los microelectrodos directamente en oro. Éste material nos permite una ventana de trabajo más amplia, evitando que la formación de hidrógeno en la superficie del electrodo interfiera en las medidas de oxígeno.

- Uso de una pcb rígida, dado que facilita la repetitividad del experimental respecto al uso de cables.
- Implementación de más microelectrodos en el MEA con el objetivo de obtener más puntos de información de la concentración de oxígeno en el interior del gránulo.

Partiendo de estas premisas se diseñaron unos MEA que constaban de 11 microelectrodos circulares de 50 $\mu$ m de radio, distribuidos a lo largo de 1,55mm (Fig 4.13)



**Fig. 4.13.** Esquema MEAs 11x50 $\mu$ m

En estos nuevos MEA se implementó el electrodo de referencia en el propio MEA, eliminando la necesidad de macroelectrodos en el experimental, dado que a este tamaño de electrodo se pueden realizar medidas a dos puntas, sin necesidad de utilizar un tercer electrodo que registre la diferencia de potencial entre el de trabajo y el referencia.

Estos nuevos MEA se fabricaron mediante la tecnología de transparencia. Esta tecnología resultó tener una precisión insuficiente para esta escala de microelectrodos, dando lugar a microelectrodos de formas y tamaños irregulares (Fig 3.6.).

Se concluyó que para trabajar a esta escala sería preferible usar la tecnología de máscaras en lugar de las transparencias. Esta técnica resulta más cara, pero es más precisa y, además, estas máscaras son reutilizables.



## 5. Conclusiones

El objetivo primero de este proyecto era el análisis de la viabilidad del uso de MEAs fabricados mediante tecnología CMOS como microsondas que permitiesen realizar medidas de oxígeno disuelto en el interior de biomasa.

Tras el estudio, caracterización y modificación de unos MEAs ya fabricados para otra aplicación se verificó la viabilidad del proyecto y se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Los microelectrodos de oro dan mejores resultados en las mediciones de oxígeno disuelto debido a que tienen una menor afinidad con el hidrógeno que los platino, ampliando la ventana de potenciales de trabajo
- La modificación de la superficie del electrodo mediante electrodeposición de un metal rugoso mejora la respuesta del electrodo aumentando su sensibilidad. Sin embargo, esta superficie rugosa resulta más atractiva para los elementos pasivantes, lo que causará una mayor pérdida de sensibilidad por uso del microelectrodo.
- El recubrimiento con pHEMA de los microelectrodos modificados por electrodeposición mejora, además de sus propiedades mecánicas, la respuesta del electrodo a lo largo del tiempo, haciendo que la sensibilidad se mantenga estable durante un mayor período de tiempo.

A partir de la experiencia obtenida en el trabajo con los microelectrodos iniciales, se diseñaron unos MEA específicos para aplicación de interés.

Se concluye de este proyecto la viabilidad del uso de este tipo de microsensores como sondas para medir oxígeno disuelto en el interior de biomasa, amén de otras muchas aplicaciones relacionadas.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Baena, B. "Desarrollo de microanalizadores mediante tecnología LTCC para la monitorización de parámetros ambientales". Universitat Autònoma de Barcelona (2009)
2. Buck, R.P. et al. "Microelectrodes. Definitions, characterization and applications" IUPAC, Analytical Chemistry Division. Commission of electroanalytical chemistry (2000)
3. De la Rosa, C. y Yu, T. "Three dimensional Mapping of Oxygen Distribution in Wastewater Biofilms Using an Automation System Microelectrodes" Department of Civil and Environmental Engineering, University of Alberta (2005)
4. Del Campo, F.J. et al. "Continuous measurement of acute toxicity in water using a solid state microrespirometer" Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de biotecnologia i biomedicina (IBB-UAB) (2007)
5. Fisher, A. C. "Electrode Dynamics" Oxford Chemistry Primers (1996)
6. Gamisans, X. "Microsensor development for biofilm profiling" Universitat Politècnica de Catalunya
7. Girishkumar, G. et al. "Carbon Nanostructures in Portable Fuel Cells: Single-Walled Carbon Nanotube Electrodes for Methanol Oxidation and Oxygen Reduction.

8. Godino, N. et al. "Measuring acute toxicity using a solid-state microrespirometer Part II. A theoretical framework for the elucidation of metabolic parameters" Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM) (2008)
9. Marsili, E. et al. "Microbial Biofilm Voltammetry: Direct Electrochemical Characterization of Catalytic Electrode-Attached Biofilms" University of Minesota, Biotechnology Institute (2008)
10. Olivé-Monllau, R. et al. "Strategies for the optimization of carbon nanotube/polymer ratio in composite materials: Applications as voltammetric sensors". Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Química (2010).
11. Sotiropoulos, S. et al. "Solid-state microelectrode oxygen sensors" University of Nottingham, School of Chemical, Environmental and Mining Engineering (1999)
12. Wallgren, K. "Oxygen sensors based on a new design concept for amperometric solid state devices" University of Nottingham, School of Chemical, Environmental and Mining Engineering (1999)
13. Woodard, F. "Industrial Waste Treatment Handbook" Pollution Engineering (2001)
14. Yáñez-Sedeño, P. " Microelectrodos: nuevas posibilidades de la Electroquímica Analítica" Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas. (2001)
15. "Biofiltració de contaminants gasosos en aire: Caracterització de paràmetres clau per l'estudi i modelització del creixement de biomassa"
16. "Microelectrónica de Silicio. Fabricación de microsensors" Centro Nacional de Microelectrónica, CNM-UAB.
17. [http://en.wikipedia.org/wiki/Oxygen\\_sensor](http://en.wikipedia.org/wiki/Oxygen_sensor)

18. [http://www.crison.es/pdfs/09/crison\\_9\\_1.pdf](http://www.crison.es/pdfs/09/crison_9_1.pdf)
19. <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?id=54362>
20. <http://www.answers.com/topic/cyclic-voltammetry>
21. <http://www.emison.com/145.htm>
22. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/396/biofiltra.html>
23. <http://www.cua.uam.mx/docs/CNI/profesores/archivos/296.pdf>
24. [http://es.wikipedia.org/wiki/Granulación\\_aerobia](http://es.wikipedia.org/wiki/Granulación_aerobia)
25. [http://en.wikipedia.org/wiki/Field\\_emission\\_microscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Field_emission_microscopy)
26. [http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_de\\_fuerza\\_atómica](http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_de_fuerza_atómica)